



Avaliação de taninos condensados, antocianinas e precursores de aroma ao longo da maturação em castas tintas: Efeito da altitude da vinha

Catarina Alexandra Figueiredo Dias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em:
Viticultura e Enologia

Orientador: Doutor Jorge M. Ricardo da Silva

Co – orientador: Licenciado João do Ó Marques

Júri:

Presidente:

Doutor Manuel Fernando Belo Moreira, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais:

Doutor Rogério Albino Neves de Castro, Professor Catedrático aposentado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Licenciado João do Ó Marques, na qualidade de especialista

Lisboa, 2011

‘No banquete da vida a amizade é o pão, e o amor é o vinho’.

Paolo Mantegazza

Dedico este trabalho aos meus PAIS

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Companhia das Quintas pela oportunidade dada para efectuar a parte experimental para a minha dissertação. Em particular agradeço ao Engenheiro Nuno do Ó pela sugestão do tema bem como ao Engenheiro João do Ó Marques pelo interesse, pela amizade e pelo apoio que demonstrou ao longo desta longa caminhada.

Não posso deixar de agradecer também ao Engenheiro José Barbosa que permitiu a recolha de amostras na Quinta Cova da Barca e facultou muita informação para incluir neste trabalho.

Agradeço também ao professor Jorge Ricardo da Silva não só por ter aceite a orientação deste trabalho, pelo entusiasmo demonstrado e pela ajuda incondicional ao longo desta experiência, mas também pelo apoio prestado ao longo deste mestrado.

Agradeço aos restantes professores do mestrado, que batalharam diariamente para fazer de nós melhores profissionais no futuro.

Agradeço à D.Graziela Rodrigues pela sua total disponibilidade para a parte prática deste trabalho bem como todos os conhecimentos que adquiri em laboratório, e à D. Maria Júlia Barata por toda sua simpatia no tempo que esta experiência durou.

Não posso deixar de agradecer aos meus queridos colegas e amigos de faculdade, Inês Oro, Inês Madeira, Susana Faia, Kiki, Cati, Ricardo Chagas, Sara Cruz, Andreia Cardoso, pelas horas que passamos juntos a dar ânimo uns aos outros. Por todo o tempo que passamos a estudar para testes e exames ou a fazer trabalhos que fez de nós uma verdadeira família.

Aos meus restantes amigos pois estiveram sempre a meu lado nos bons e maus momentos, em particular à Madalena por todo o seu apoio, amizade e até pelas loucuras que sempre contou, fazendo-me rir em alturas mais complicadas.

A todos os que me acompanharam nas longas viagens às quintas em estudo e que me ajudaram na recolha das amostras.

Ao meu grande amigo que com muito orgulho também é meu irmão por toda a ajuda que meu deu para fazer este trabalho e por me incentivar a procurar aprender mais e a nunca desistir dos meus sonhos. Obrigado Bro

À minha afilhada Cristiana, pois foi ela que me fez rir nos momentos mais difíceis desta longa caminhada.

Aos meus avós, mesmo os que já partiram, pois também eles foram responsáveis por eu ser o que sou hoje.

Agradeço aos meus tios e aos meus primos por toda a força e energia que me deram para eu continuar o meu caminho, pois fizeram-no parecer mais curto

À Tia JuJu e ao Tio Nandinho, por todo o carinho, toda motivação e apoio neste últimos anos.

Agradeço ao Gonçalo, pela motivação que me deu, pela força que me transmitiu, por toda a paciência que teve nos momentos mais trabalhosos e acima de tudo por todo o amor que me deu nestes últimos anos

Finalmente e não menos importante, não podia deixar de agradecer aos meus pais, pois foram eles os principais responsáveis por este mestrado e por este trabalho, sem eles nada disto seria possível. Foram deles que me guiaram de forma a alcançar os meus desejos. A eles devo tudo o que sou e tudo o que tenho.

A todos vós MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Este estudo pretende avaliar a influência da altitude sobre os compostos fenólicos bem como os precursores glicosilados do aroma, nas castas Touriga Nacional e Touriga Franca.

Recolheram-se várias amostras ao longo da maturação em duas quintas com diferentes altitudes, a Quinta Cova da Barca, no Douro Superior, encontra-se a 125m de altitude e a Quinta do Cardo, na Região da Beira Interior (Sub-região de Castelo Rodrigo), a 700m de altitude.

Os resultados obtidos mostram que há uma tendência para valores mais elevados de antocianinas, intensidade da cor e % Prodelfinidinas dos taninos condensados nas vinhas situadas a uma maior altitude.

No caso das proantocianidinas e da % de esterificação com o ácido gálico esta tendência inverte-se, uma vez que este valor é superior nas vinhas que apresentam uma altitude inferior, sendo este facto visível em ambas as castas.

Quanto ao Grau médio de polimerização, verificam-se diferenças ao comparar ambas as castas. No caso da Touriga Nacional este valor é superior na Quinta do Cardo (Alta altitude), o mesmo não acontece com a Touriga Franca, uma vez que é na baixa altitude que este valor é superior.

Finalmente, analisando os precursores glicosilados, entram-se diferenças ainda que tenham expressão estatística. Na vinha mais alta, os precursores de aroma tendem a assumir um valor mais elevado, exceptuando no final da maturação

Palavras Chave: Altitude, Antocianinas, Proantocianidinas, G-G, Touriga Franca, Touriga Nacional.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the influence of altitude on the phenolic compounds and the precursors of aroma glycosides in Touriga Nacional and Touriga Franca.

It was gathered from several samples along the maturation of two vineyard with different altitudes, Quinta Cova da Barca. In Douro Superior, is at an altitude of 125m and 700m at Quinta do Cardo, in Beira Interior (Sub-region Castelo Rodrigo).

The results show that there is a tendency to higher values of anthocyanins, color intensity and % prodelfinidyn of condensed tannins in the vineyards at a higher altitude.

In the case of proanthocyanidins and the % esterification with acid gálhico this tendency is reversed, since this is higher than in the vineyards that have a lower altitude, which is indeed visible in both variety.

As for the degree of polymerization, there are differences when comparing both variety. Touriga Nacional in this case is higher than in Quinta do Cardo (high altitude), the same is not true of Touriga Franca, since it is at a low altitude that the degree is higher.

Finally, analyzing the glycosylated precursors, there are still differences that are not statistically significant. Highest in the vineyard, the precursors of aroma tend to take a higher value, except when matured.

Key-Words: Altitude, Anthocyanin, Proanthocyanidin, G-G, Touriga Franca, Touriga Nacional

EXTENDED ABSTRACT

This test was performed to assess the effect of altitude difference in phenolic compounds as well as the glycosylated precursors.

There were gathered samples frequently throughout the maturation in the 2009/2010 campaign on two farms with different altitudes in Touriga Nacional and Touriga Franca. 700 meters altitude, in Beira Interior, is the Quinta do Cardo. At a lower elevation (125 m) in the Douro Superior, is the Quinta Cova da Barca.

The samples were brought to the laboratory where they were prepared for extraction of the compounds under study. We determined the weight and volume as well as pH, total acidity and ° Brix using the usual method of the OIV. The extraction method used was proposed by Carboneau and Champagnol (1993) and through this it was determined: total anthocyanins (Ribéreau-Gayon (1965)), index of total phenols (Ribéreau-Gayon (1968)) as well as proanthocyanidins and their structural characteristics. Since the splitting of flavanols occurred on a Fractogel column, according to Labarbe et al. (2000) and the determination of proanthocyanidins and their structural characteristics by thiolysis (Monagas et al. (2003) and Cosme et al. (2009)), finally, the aroma precursors were determined by the method G-G proposed by Williams *et al.*, 1995b and Lland *et al.* (1996).

With altitude variation its expected variation in climatic conditions, as a rule if we are in a higher elevation the temperature and humidity are lower. And so the maturation conditions are different in each vineyard.

This variation appears immediately in anthocyanins, the intensity of color and aroma precursors, since they have a higher value in vineyards located in the highest quota in both varieties studied.

In the other parameters this finding is not so trivial, since it note some changes during maturation. An example of that are the results of prodelfinidin, since they assume a higher value in Quinta do Cardo, however not constant during the maturation. The results' observed of proanthocyanidins and the percentage gallic acid esterification show some fluctuations, but it's at low altitude that they assume a higher value.

In the mean degree of polymerization, there are two situations: In Touriga Franca mDP is higher in the vineyards to a lower level, this situation is reversed in Touriga Nacional whose value is higher in the vineyards that are higher.

Analyzing the results in general, there is a tendency for the maturation conditions that are most conducive to the healthy development of berries in Quinta do Cardo, because there are higher values in respect of the most important parameters.

Índice

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
EXTENDED ABSTRACT	viii
Índice de Figuras e Quadros	xi
Índice de Figuras	xi
Índice de Quadros	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	- 1 -
2. Compostos fenólicos.....	- 3 -
2.1 Antocianinas	- 4 -
2.2 Taninos.....	- 5 -
3. Aroma Varietal.....	- 8 -
3.1 Compostos envolvidos no Aroma Varietal	- 9 -
3.2 Precursores de Aroma	- 9 -
3.2.1 Precursores glicosilados.....	- 11 -
3.3 Hidrólise ácida.....	- 12 -
3.4 Hidrólise enzimática	- 12 -
4. Evolução dos compostos fenólicos e dos precursores de aroma ao longo da maturação.....	- 13 -
4.1 Evolução das antocianinas nas uvas ao longo da maturação.....	- 14 -
4.2 Evolução das proantocianidinas das uvas ao longo da maturação.....	- 15 -
4.3 Evolução dos precursores de aroma ao longo da maturação	- 16 -
5. Factores agronómicos que influenciam o teor de compostos fenólicos e de precursores de aroma.....	- 17 -
6. Objectivos do trabalho.....	- 18 -
7. Material e Métodos	- 19 -
6.1 Caracterização da experiência	- 19 -
6.1.1 Região demarcada do Douro e caracterização do local de ensaio	- 19 -
6.1.2 Região demarcada da Beira Interior e caracterização do local de ensaio	- 20 -
6.2 Castas estudadas	- 22 -
6.2.1 Touriga Nacional.....	- 22 -
6.2.2 Touriga Franca.....	- 22 -
6.3 Metodologia analítica	- 23 -

7. Resultados e Discussão.....	- 29 -
7.1 Evolução da maturação	- 29 -
7.2 Influência da altitude	- 30 -
7.2.1 Antocianinas.....	- 31 -
7.2.2 Intensidade da cor	- 32 -
7.2.3 Índice de Fenóis Totais	- 34 -
7.2.4 Análise química detalhada das proantocianidinas do bago.....	- 35 -
7.2.4.1 Grau médio de polimerização das proantocianidinas (mDP).....	- 35 -
7.2.4.2 Percentagem de esterificação pelo ácido Gálico nas unidades monoméricas das Proantocianidinas (%g)	- 37 -
7.2.4.3 Percentagem de Prodelphinidinas nos taninos condensados (%p)	- 38 -
7.2.4.4 Teor de Proantocianidinas do bago	- 40 -
7.2.5 Precursores de aromas	- 41 -
8. Conclusão	- 45 -
Com base nos resultados obtidos, apresentam-se agora as principais conclusões a retirar.	- 45 -
9. Referências bibliográficas.....	- 47 -
Anexos	- 56 -

Índice de Figuras e Quadros

Índice de Figuras

FIGURA 1 - ESTRUTURA FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES	- 3 -
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA ANTOCIANIDINAS 3-GLUCÓSIDO.....	- 4 -
FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS FLAVAN-3-ÓIS MAIS ABUNDANTES EM ALIMENTOS.....	- 6 -
FIGURA 4 - DECOMPOSIÇÃO DAS PROANTOCIANIDINAS POR AQUECIMENTO E EM MEIO ÁCIDO (BATE-SMITH, 1954A).	- 7 -
FIGURA 5 – ESQUEMA BIOTECNOLÓGICO E COMPONENTES DO AROMA VARIETAL.....	- 8 -
FIGURA 6 – POTENCIAL AROMÁTICO DA UVA (ADAPTADO DE BAUMES <i>ET AL.</i> , 1994).....	- 10 -
FIGURA 7 - GLICOSÍDEOS E ALGUMAS AGLICONAS ENCONTRADOS NA UVA (ADAPTADO DE BAYONOVE, 1992).....	- 11 -
FIGURA 8 - MECANISMO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS PRECURSORES GLICOSILADOS (OLIVEIRA, 2000)	- 13 -
FIGURA 9 - EVOLUÇÃO DOS CAROTENÓIDES E DOS NORISOPRENÓIDES EM C13 AO LONGO DA MATURAÇÃO EM UVAS DA CASTA <i>MUSCAT D'ALEXANDRIE</i> (ADAPTADO DE RAZUNGLES <i>ET AL.</i> , 1993). TESE OLIVEIRA.....	- 17 -
FIGURA 10: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NAS ANTOCIANINAS NA CASTA TOURIGA FRANCA (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	- 31 -

FIGURA 11: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NAS ANTOCIANINAS NA CASTA TOURIGA NACIONAL (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	32 -
FIGURA 12: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NA INTENSIDADE DA COR NA CASTA TOURIGA FRANCA (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	33 -
FIGURA 13: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NA INTENSIDADE DA COR NA CASTA TOURIGA NACIONAL (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	33 -
FIGURA 14: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NOS IFT NA CASTA TOURIGA FRANCA; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	34 -
FIGURA 15: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NOS IFT NA CASTA TOURIGA NACIONAL; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	35 -
FIGURA 16: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NO DPM NA CASTA TOURIGA FRANCA; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	36 -
FIGURA 17: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NO DPM NA CASTA TOURIGA NACIONAL; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	36 -
FIGURA 18: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NA %G NA CASTA TOURIGA FRANCA (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	37 -
FIGURA 19: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NA %G NA CASTA TOURIGA NACIONAL; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	38 -
FIGURA 20: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NA %P NA CASTA TOURIGA FRANCA; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	39 -
FIGURA 21: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NA %P NA CASTA TOURIGA NACIONAL; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO HAVER DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	39 -
FIGURA 22: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NAS PROANTOCIANIDINAS NA CASTA TOURIGA FRANCA; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO EXISTIR DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	41 -
FIGURA 23: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NAS PROANTOCIANIDINAS NA CASTA TOURIGA NACIONAL; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO EXISTIR DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	41 -
FIGURA 24: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NOS PRECURSORES DE AROMA POR G-G NA CASTA TOURIGA FRANCA; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO EXISTIR DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	43 -
FIGURA 25: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE NOS PRECURSORES DE AROMA POR G-G NA CASTA TOURIGA NACIONAL; (MÉDIAS COM A MESMA LETRA INDICAM NÃO EXISTIR DIFERENÇAS ENTRE SI PARA UM $P < 0.05$)	43 -

Índice de Quadros

QUADRO 1: CARACTERIZAÇÃO DAS VINHAS DA QUINTA DO CARDO	21 -
QUADRO 2: DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E RESPECTIVO MÉTODO	23 -
QUADRO 3: RENDIMENTO EM TON/HA À VINDIMA NAS CASTAS TOURIGA NACIONAL E TOURIGA FRANCA	29 -
QUADRO 4: CONTROLO DE MATURAÇÃO DAS UVAS DA CASTA TOURIGA FRANCA RECOLHIDAS NA QUINTA COVA DA BARCA	29 -
QUADRO 5: CONTROLO DA MATURAÇÃO DAS UVAS DA CASTA TOURIGA FRANCA RECOLHIDAS NA QUINTA DO CARDO	29 -
QUADRO 6: CONTROLO DA MATURAÇÃO DAS UVAS DA CASTA TOURIGA NACIONAL RECOLHIDAS NA QUINTA COVA DA BARCA	30 -
QUADRO 7: CONTROLO DA MATURAÇÃO DAS UVAS DA CASTA TOURIGA NACIONAL RECOLHIDAS NA QUINTA DO CARDO	30 -
QUADRO 8: PRECURSORES DE AROMA EM $\mu\text{MOL/G}$ BAGO E $\mu\text{MOL/BAGO}$ À VINDIMA, NAS CASTAS TOURIGA NACIONAL E TOURIGA FRANCA, NAS QUINTAS COVA DA BARCA E DO CARDO.	44 -

Lista de abreviaturas

Abs₂₈₀ – Absorvância a 280 nm

Abs₄₂₀ – Absorvância a 420 nm

Abs₅₂₀ – Absorvância a 520 nm

Abs₆₂₀ – Absorvância a 620 nm

%g – Percentagem de esterificação pelo ácido gálgico nas unidades monoméricas das proantocianidinas

%p - Percentagem de prodelfinidinas nos taninos condensados

mDP – Grau médio de polimerização das proantocianidinas

TF – Touriga Franca

TN – Touriga Nacional

IFT – Índice de fenóis totais

QCB – Quinta Cova da Barca

QC – Quinta do Cardo

1. Introdução

Numa altura em que os consumidores estão mais informados e exigem produtos cada vez com mais qualidade muitas vezes com a preocupação relacionada com questões de saúde, surge a necessidade da fileira vinícola se adaptar a esta nova situação bem como optar por diferentes estratégias: 'Casta', 'terroir' ou ainda na diversificação de produtos (Bayonove, 1998).

Por este motivo têm sido realizados cada vez mais os estudos que visam compreender a forma como os compostos existentes na uva e no vinho se comportam, nomeadamente em função das tecnologias vitícolas e enológicas utilizadas.

O vinho é uma mistura química muito complexa constituída por compostos fenólicos, polissacáridos, precursores de aroma, proteínas, açúcares, entre outros. No conjunto destes compostos os que aparentemente mostram uma maior expressão na qualidade das uvas e dos vinhos são os compostos fenólicos e o de aroma varietal.

Os compostos fenólicos desempenham um papel muito importante na qualidade do vinho, devido ao seu contributo nas características organolépticas, nomeadamente na cor (como é o caso das antocianinas) e também nas sensações gustativas, devido ao seu contributo na adstringência e amargor (da responsabilidade de ácidos fenólicos e flavanóis) (Ribichaud & Noble, 1990)

Para além do que estes compostos representam em Enologia, cada vez é maior o interesse em estudar certos compostos, nomeadamente flavonóides (Proantocianidinas), estilbenos (resveratrol) e ácidos fenólicos devido ao seu potencial benéfico na saúde humana. (Soleas *et al.*, 1992). Muitos são os efeitos atribuídos a estes compostos, como por exemplo, acção antibacteriana, antiviral, anticarcinogénica, anti-inflamatória, antialérgica e acção vaso protectora (Ivanov *et al.*, 2001; Laranjinha & Cadenas, 1999; Santos-Buelga & Scalbert, 2000), sendo já conhecidas as suas propriedades antioxidantes.

Assim, os potenciais efeitos biológicos de um vinho no que diz respeito à prevenção de doenças, depende muito da quantidade de compostos fenólicos.

O aroma constitui certamente, e na sua globalidade, uma das características organolépticas mais importantes definidoras da qualidade e tipicidade dos vinhos (Curvelo-Garcia, 1988). Este é um tema bastante complexo pois resulta da combinação de vários compostos voláteis com origem em diferentes mecanismos de

natureza biológica, bioquímica e tecnológica. A diversidade de compostos voláteis bem como os mecanismos que lhes dão origem tornam o seu estudo mais difícil.

Muitos têm sido os estudos a estes compostos nos últimos anos, que permitiram um conhecimento qualitativo e quantitativo dos compostos de aroma no vinho (Ferreira *et al.*, 2000).

2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que abundam nos tecidos vegetais, e são caracterizados por possuírem, pelo menos, um grupo oxidrilo (-OH) ligado directamente a um anel benzénico.

Estes compostos podem ser divididos em duas classes de acordo com a sua natureza química, compostos de natureza não Flavonóide e compostos de natureza Flavonóide, sendo esta distinção feita com base na estrutura carbonada específica.

No grupo dos compostos de natureza não Flavonóide encontram-se os ácidos fenólicos, que se dividem em ácidos benzóicos (C6-C1) e ácidos cinâmicos, que possuem uma cadeia natural insaturada (C6-C3) normalmente estes ácidos encontram-se esterificados com açúcares, ácidos orgânicos ou álcoois. Encontram-se ainda dentro deste grupo outros derivados fenólicos como é o caso dos estilbenos.

O grupo de compostos de natureza flavonóide é caracterizado por uma estrutura C6-C3-C6, sendo a sua estrutura base dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C), a figura 1 demonstra a estrutura.

A estrutura e a cor do vinho são da responsabilidade desta família de compostos, que se encontram em grainhas, polpa, película e até nos engaços das uvas. De todos eles as antocianinas, o flavan-3-ol e as proantocianidinas os principais responsáveis pela cor dos vinhos, sendo quantitativamente os mais importantes.

Já foram identificados 4000 flavonóides, os quais podem ser divididos em várias classes de acordo com a sua estrutura molecular base. Destacam-se as antocianinas, os flavonóis e os flavanóis.

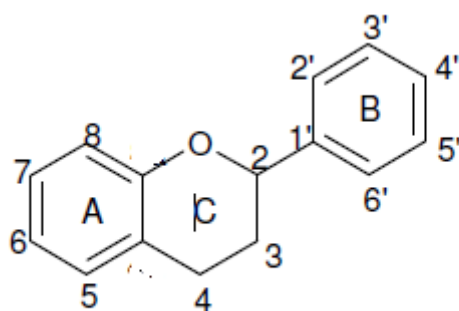


Figura 1: Estrutura fundamental dos flavonóides

2.1 Antocianinas

São estes os compostos que mais importância têm no que diz respeito à cor das uvas e dos vinhos. As antocianinas representam uma parte muito importante quer quantitativamente quer qualitativamente dos flavonóides das uvas das castas tintas.

Estas encontram-se nas películas e nas três ou quatro primeiras camadas da hipoderme bem como na polpa de castas tintureiras, mais propriamente nos vacúolos celulares, acumulando-se no início do pintor até à maturação seguindo o ritmo de acumulação dos açúcares (Pirie e Mullins, 1977).

A designação genérica 'antocianinas' é usada para designar as agliconas (antocianidinas) ou as suas formas heterósidas (antocianinas).

Identificam-se, na uva e no vinho, cinco moléculas de antocianinas, consoante a substituição do radical lateral, distinguindo-se entre si pelo grau de hidroxilação e metoxilação do anel benzénico. As antocianinas do género *vitis* são a cianidina, a delphinidina, a peonidina, a petunidina e malvidina. As suas quantidades variam de casta para casta, sendo a malvidina a maioritária. Recentemente, foi encontrada uma antocianina nas uvas e no vinho, a pelargonidina. De acordo com Castilho-Munoz *et al.* (2009) é possível encontrar pelargonidina 3-glucósido bem como as suas formas acetiladas e cumariladas em uvas de *Vitis vinífera* (Figura 2).

É característico das *vitis vinífera* encontrar-se uma molécula de glucose ligada na posição 3, uma vez que outras espécies são diglucósidas nas posições 3 e 5 (Ribéreau-Gayon e Stenestreet, 1965).

Os principais ácidos que podem esterificar a glucose na posição 6, são o ácido caféico, o ácido p-cumárico e o ácido acético.

R1	R2	Antocianina
H	H	Pelargonidina-3-glucósido
OH	H	Cianidina-3-glucósido
OH	OH	Delfinidina-3-glucósido
OCH ₃	H	Peonidina-3-glucósido
OCH ₃	OH	Petunidina-3-glucósido
OCH ₃	OCH ₃	Malvidina-3-glucósido

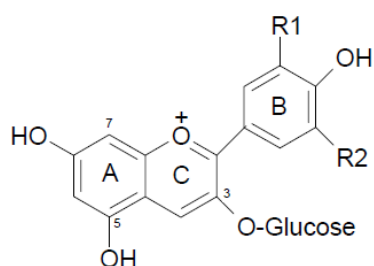


Figura 2: Estrutura da antocianidinas 3-glucósido

A cor e a estabilidade das antocianinas dependem do número e da natureza dos substituintes. Enquanto a hidroxilação conduz ao aumento da tonalidade azul, a metoxilação tem o efeito oposto, enaltecendo a tonalidade vermelha. Por outro lado, as antocianinas metoxiladas são mais estáveis que as hidroxiladas, uma vez que as moléculas orto-hidroxiladas são transformadas mais facilmente em quinomas (Bourzeix, 1976). A um determinado pH as antocianinas-3-glucósido são mais coradas que as antocianinas-3,5-diglucósido. Da mesma forma as antocianinas podem ser coradas ou não consoante o pH do meio, a sua concentração e a presença ou não de co-pigmentação (Mazza e Brouillard, 1987).

Como já foi referido para além do pH, as interacções moleculares das antocianinas com outros compostos afectam a sua estabilidade, contribuindo desta forma para a enorme variedade de cores que estes pigmentos exibem (Heredia *et al.*, 1998). A este fenómeno dá-se o nome de co-pigmentação.

Neste fenómeno ocorre uma interacção molecular através ligações de hidrogénio e interacções hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas (não coradas) que actuam como copigmentos (Davies & Mazza, 1993).

Os copigmentos encontrados, pertencem a diversas famílias de compostos tais como flavonóides (em particular os flavanóis), ácido fenólicos, alcalóides, aminoácidos e ácidos orgânicos.

2.2 Taninos

Os taninos são compostos hidrossolúveis com pesos moleculares entre os 500 e alguns milhares de Dalton, que para além das reacções normais das moléculas fenólicas, apresentam capacidade para reagir com alcalóides, gelatina e outras proteínas formando precipitados (Bate-Smith *et al.*, 1962). Esta definição exclui um grande número de compostos de menor peso molecular que anteriormente eram classificados como taninos.

Os taninos podem então ser divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (proantocianidinas).

Taninos condensados (Proantocianidinas ou Flavanóis)

Os taninos condensados, também denominados de proantocianidinas, são constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-óis.

As várias formas de estrutura dos flavan-3-óis existentes na natureza diferem na estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel C (C2 e C3) bem como no grau de hidroxilação dos anéis A e B.

Os mais comuns do género *vitis* encontram-se hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A e variam na estereoquímica do carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B. Sendo classificados como Catequinas e Galhocatequinas. As Catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) encontram-se hidroxilados nas posições 3' e 4' do anel , enquanto as Galhocatequinas ((+)-galhocatequinas e (-)-epigalhocatequinas) se encontram hidroxiladas nas posições 3', 4' e 5' do anel B.

Os flavan-3-óis podem ainda encontrar-se esterificados com o ácido gálico ou glicosilados na posição O-3 do anel pirânico C (Piretti *et al.*, 1976; Lee & Jaworski, 1990), embora a forma glicosilada seja pouco comum no reino vegetal (Porter, 1988). As proantocianidinas são derivados estruturais dos flavan-3-óis e de acordo com o número de vezes que esta unidade se repete, assim as proantocianidinas são diméricas, triméricas, oligoméricas (até 6 unidades) ou poliméricas (superior a 6 unidades).

As proantocinidinas são compostos que libertam antocianidinas quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a ruptura das ligações entre as unidades monoméricas (Ricardo-da-Silva, 1995), conforme o esquematizado na figura 4.

Existem dois grandes grupos de proantocianidinas, em função da unidade monomérica. Caso se liberte a cianidina as moléculas recebem o nome de procianidina, sendo esta um polímero de catequina e epicatequina. No caso de ocorrer a libertação de delphinidina, a molécula recebe o nome de prodelfinidina, sendo esta um polímero de epigalhocatequina e galhocatequina.

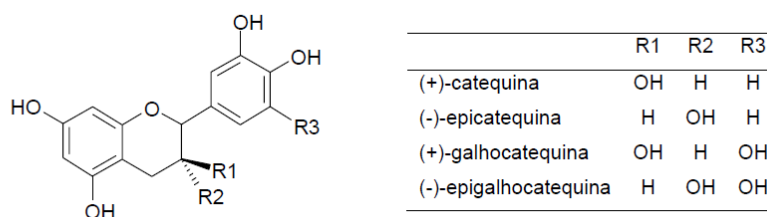


Figura 3: Estrutura dos flavan-3-óis mais abundantes em alimentos

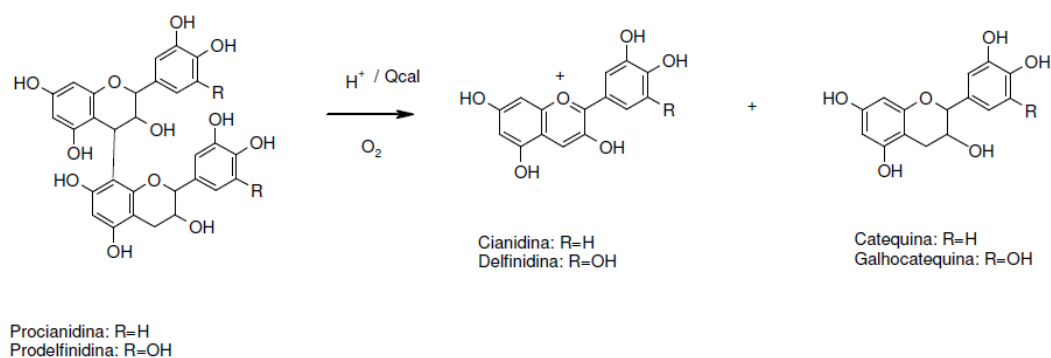


Figura 4: Decomposição das proantocianidinas por aquecimento e em meio ácido (Bate-Smith, 1954a).

As proantocianidinas encontram-se nas partes sólidas do cacho de uvas: películas, grainhas, engaços e em menor quantidade na polpa. Os seus teores bem como as suas características estruturais nos constituintes do cacho variam, estando mais concentrados nuns em detrimento de outros.

Vários estudos mostram que é nas películas das uvas que se observa um maior grau médio de polimerização em relação dos restantes constituintes do cacho (Cosme *et al.*, 2009; Mané *et al.*, 2007).

Outra característica muito estudada é a percentagem de esterificação com o ácido gálico, e tudo aponta para valores superiores nas grainhas, seguindo-se os engaços, a película e finalmente a polpa.

Finalmente, a percentagem de prodelfinidinas assume maiores valores nas películas seguindo-se os engaços e finalmente a polpa. Nas grainhas não se detecta epigallocatequina e consequentemente prodelfinidinas (Souquet *et al.*, 2000)

3. Aroma Varietal

Os constituintes do aroma do vinho são classificados em quatro componentes de acordo com a sua origem no decorrer do processo tecnológico: Varietal, Pré-Fermentativo, Fermentativo e Pós-Fermentativo (Figura 5) (Cordonnier et al, 1979; Crouzet, 1986; Bayonove et al, 2000).

Ao aroma varietal e pré-fermentativo também é conhecido por aroma primário, o aroma fermentativo por aroma secundário e o aroma pós-fermentativo por aroma terciário, segundo a classificação proposta por Lepe (1995) e Peynaud e Blouin (1997).

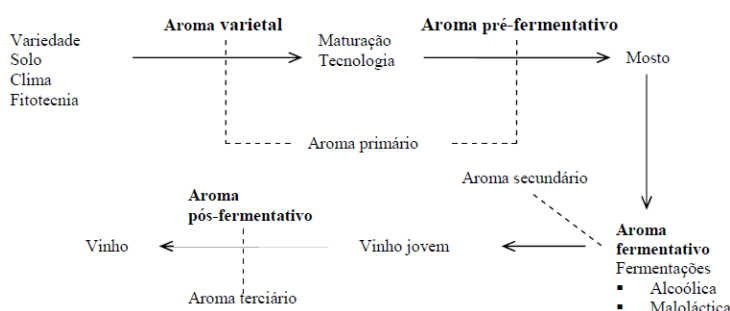


Figura 5: Esquema biotecnológico e componentes do aroma varietal

Diferentes factores influenciam a percentagem de compostos do aroma presentes no vinho: condições climáticas, tipo de solo, casta, condições de fermentação (Temperatura, pH, microflora, etc.) e os tratamentos pré-fermentativos como são o caso da clarificação (Stidwell, 2001)

É a componente varietal, proveniente das uvas, que é em parte a responsável pela tipicidade e originalidade aromática do vinho. (Guñata, 1995).

De acordo com Cordonnier e Bayonove (1979) o aroma varietal é a parte do aroma de um vinho ligada à variedade de onde este é proveniente. Este aroma pode ser directamente reconhecível na uva, caso das castas aromáticas como os moscatéis, ou somente se revelar no decorrer da fermentação e da conservação do vinho. Este fenómeno permite explicar o facto de castas neutras originarem vinhos aromáticos

com características particulares, indissociáveis da variedade (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2001) como é o caso do Cabernet Sauvignon.

Torna-se assim necessário introduzir o conceito de precursor de aroma na definição de aroma varietal. Os precursores de aroma, também conhecidos por fracção ligada do aroma, constituem uma espécie de reservatório de aroma, e são sobretudo substâncias não voláteis capazes de originar compostos aromáticos pela acção de certas enzimas..

3.1 Compostos envolvidos no Aroma Varietal

A grande maioria dos compostos associados ao aroma varietal encontra-se na película dos bagos, sendo a sua existência possível, ainda que com menos frequência, na polpa do fruto (Bayonove e Cordonnier, 1971).

Os principais compostos envolvidos no aroma varietal são os compostos monoterpénicos e aparentados, os norisoprenóides em C₁₃. Acredita-se que são estes os que mais contribuem qualitativamente e qualitativamente no aroma varietal (Ricardo da Silva, 2000).

Para além destes compostos, encontram-se numa escala menor outros compostos como é o caso de álcoois e aldeídos aromáticos, álcoois lineares, ácidos gordos, fenóis voláteis, S-conjugados de cisteína e as metoxipirazinas.

3.2 Precursores de Aroma

Todas as castas do género *vitis vinífera* até hoje estudadas mostram diferentes composições de metabolitos secundários como é o caso dos álcoois terpénicos, norisoprenóides e benzenóides. Tendo como base estas diferenças, é possível então caracterizar o carácter varietal de uma casta (Di Stefano, 1996).

O potencial aromático, representado na figura 7, da uva bem como do mosto e do vinho é constituído por uma parte que se encontra na forma livre referente aos compostos voláteis e que é directamente odorante outra parte do aroma que se encontra na forma ligada, dizendo respeito aos precursores de aroma e à partida não são odorantes

Qualquer estrutura química dos compostos que contribuem para o aroma varietal pode ser encontrada, quer no bago, no mosto ou no vinho, no estado de aroma livre ou ligado. Em regra, os compostos encontram-se mais na forma de precursor do que no estado livre (Cordonnier e Bayonove, 1979).

Assim, precursores de aroma varietal é um termo genérico utilizado para designar todos os compostos que tendo origem na uva, são susceptíveis de originar substâncias aromáticas entre a vindima e o copo.

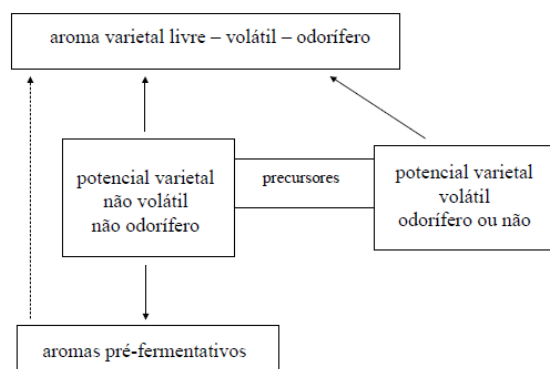


Figura 6: Potencial aromático da uva (Adaptado de Baumes *et al.*, 1994)

Existem várias substâncias que desempenham o papel de precursor de aroma e que são no caso das castas pouco aromáticas, os constituintes que contribuem de forma decisiva para o aroma dos respectivos vinhos. Os precursores de aroma são sobretudo substâncias não voláteis como os glicosídeos, ácidos fenólicos, ácidos gordos e conjugados de cisteína que podem ser transformados em compostos voláteis durante o processo de transformação, bem como durante o armazenamento e envelhecimento (Cordonnier, 1986; Bayonove, 1992).

Os precursores de aroma que se apresentam na forma glicosilada são constituídos por duas partes distintas: a aglicona e a ose. Em geral, a aglicona é constituída por terpenóis (Linalol, nerol e geraniol), óxidos de linalol, dióis e tióis terpénicos juntamente com outros compostos como álcoois cíclicos ou cadeia simples (hexanol e hexenóis), norisoprenóides em C₁₃ e fenóis voláteis como é o caso da vanilina (Williams *et al.*, 1981; Di Stefano, 1982; Guñata *et al.*, 1985b).

O mesmo se passa com os carotenóides que dão origem a compostos muito interessantes a nível olfactivo, os norisoprenóides em C₁₃, pois apresentam limiares de percepção muito baixos. (Araújo, 2004)

3.2.1 Precursores glicosilados

Tal como foi referido, ligadas às agliconas encontram-se moléculas de açúcar, podendo estas ser açúcares simples como α -arabinofurose (Ara), β -apiofuranose (Apio), α -ramnopiranosose (Ram) e β -glucopiranosose (Glu). No entanto estas encontram-se normalmente na forma de diglicósidos, e de acordo com Guñata *et al.* (1985b) as agliconas ligam-se preferencialmente à glucose, existindo também uma forma de monoglucósido. Logo os diglucósidos mais importantes são sempre constituídos por glucose, uma outra ose e uma aglicona, formando então os seguintes tipos de precursores: Ara-Glu-Aglicona, Apio-Glu-Aglicona, Ram-Glu-Aglicona e um tipo monoglucósido: Glu-Aglicona (Günata *et al.*, 1985a; Cordonnier *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 1986)

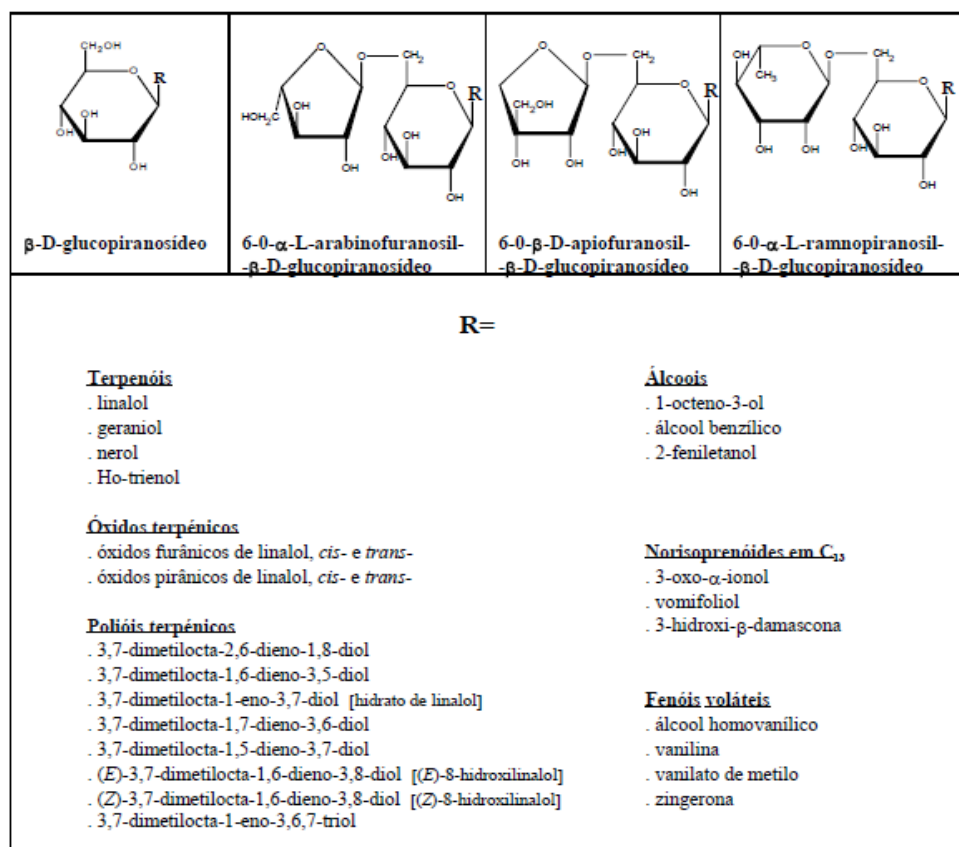


Figura 7: Glicosídeos e algumas agliconas encontrados na uva (Adaptado de Bayonove, 1992)

A hidrólise dos glicósidos liberta a aglicona e a molécula de glucose á qual se chama glucosil-glucose (G-G). A libertação dos compostos pode ocorrer por duas vias: por via ácida (Williams *et al.*, 1981 e 1982b) ou por via enzimática (Günata *et al.*, 1985a).

3.3 Hidrólise ácida

A libertação por hidrólise ácida das substâncias voláteis a partir dos precursores de aroma é um processo natural que decorre ao longo do processo de vinificação (Rapp *et al.*, 1984) especialmente no pH normal do vinho.

A temperatura, o pH e o tempo de aquecimento são os principais factores que afectam este tipo de hidrólise e, deste modo, alteram o tipo de aroma que se formam (Williams *et al.*, 1983).

De acordo com Cordonnier *et al.* (1986), o aquecimento do mosto a pH 3,2 – 3,5 parece constituir um método muito eficaz na libertação de aromas, sendo no entanto necessário controlar rigorosamente o tempo de aquecimento e a temperatura para evitar rearranjos dos terpenos e o aparecimento de novos compostos (Di Stefano *et al.*, 1981).

3.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática dos glicósidos da uva é uma reacção sequencial que decorre em duas etapas, terminando com a libertação da aglicona odorante (figura 8).

Numa primeira etapa ocorre a ruptura da ligação osídica (1→6) pela acção de uma α -arabinosidase (E.C.3.2.1.55), α -ramnosidase (E.C.3.2.1.40) ou β -apiosidase (sem número atribuído) com libertação dos monoglicósidos terpénicos, e respectivamente arabinose, ramnose ou apiose.

Na segunda etapa, intervém uma β -glucosidase (E.C. 3.2.1.21) que quebra a ligação aglicona-glucose, libertando a aglicona volátil e odorante (Günata *et al.*, 1990).

Este processo de hidrólise inicia-se já no bago sofrendo um aumento a partir do pintor até à maturação, na qual atinge o nível mais elevado (Biron *et al.*, 1988).

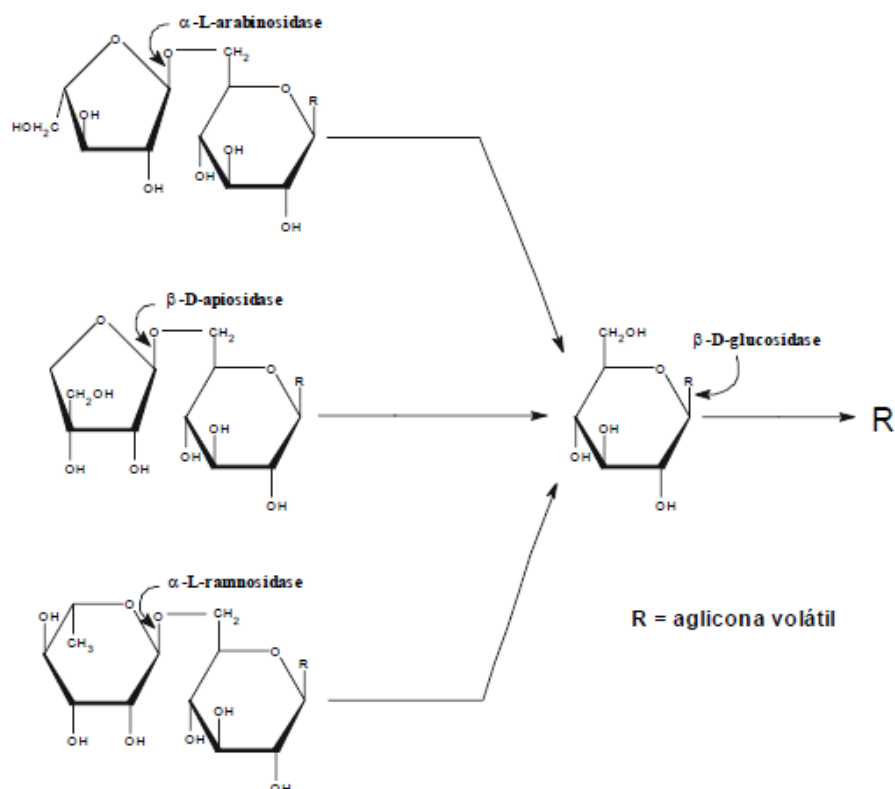


Figura 8: Mecanismo de hidrólise enzimática dos precursores glicosilados (Oliveira, 2000)

4. Evolução dos compostos fenólicos e dos precursores de aroma ao longo da maturação

O conhecimento da evolução dos compostos fenólicos bem como dos precursores de aroma ao longo da maturação torna-se fundamental para a caracterização qualitativa do produto final à vindima, pelas características que estes compostos assumem no vinho.

Então por maturação da uva entende-se como um conjunto de fenómenos bioquímicos e fisiológicos complexos onde o bom desenrolar e a sua intensidade estão em estreita dependência das condições do meio (Peynaud e Ribéreau-Gayon, 1971; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Champagnol, 1984; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). O clima, o solo, a casta, o sistema de condução, a rega e as técnicas de cultura e de vinificação, são factores que influenciam a maturação destes compostos nas uvas.

Assim, muitos são os estudos que permitem avaliar a forma como estes compostos evoluem ao longo da maturação dos bagos.

4.1 Evolução das antocianinas nas uvas ao longo da maturação

Estudos apresentados com a casta Cabernet Sauvignon (Darné, 1988) indicam que o nível de antocianinas das películas dos bagos aumenta a partir da fase do pintor. Vários autores defendem que até ao final da maturação, a evolução destes compostos, é caracterizada por três fases (Ribéreau-Gayon, 1982; Hrazdina *et al.*, 1984; Darné, 1988). Uma primeira fase em que o teor de antocianinas cresce ligeiramente, uma segunda que cresce rapidamente e por último uma terceira fase em que se verifica uma estabilização da acumulação destes compostos (Jordão *et al.*, 1998), seguida de decréscimo (Somers, 1976). No entanto, Gonzalez-San-José *et al.* (1990) estudaram a casta Tinta Roriz e verificaram um forte aumento das antocianinas totais nas últimas semanas de maturação.

Jordão *et al.* (1998), mostraram, na casta Touriga Franca, como evoluem as várias formas de antocianinas ao longo da fase de maturação. Assim verificaram que as diversas antocianinas glucosiladas bem os seus derivados cumarilados seguem uma evolução semelhante ao longo do tempo. Já os derivados acetilados mostram variações, verifica-se um aumento muito lento até 4 a 5 semanas após o pintor, ocorrendo um aumento brusco no final da maturação.

Mateus *et al.* (2002), estudaram a evolução das antocianinas ao longo da maturação, nas castas Touriga Nacional e Touriga Franca, na região do Douro, e verificaram que antocianinas glucosiladas iniciam a sua acumulação a partir do pintor. Esta acumulação ocorre até cerca de 40 a 60 dias após o pintor, dando-se um decréscimo a partir daí.

De acordo com Pereira (2008), ao comparar parâmetros analíticos de uvas e vinhos provenientes de duas vinhas com idades diferentes na região de Valdepeñas, na casta 'Tempranillo', confirmou os dados já existentes na bibliografia, isto é as antocianinas tendem a aumentar ao longo da maturação.

4.2 Evolução das proantocianidinas das uvas ao longo da maturação

As primeiras investigações, para avaliar como as proantocianidinas evoluem ao longo da maturação, referem que estes compostos sofrem um forte decréscimo logo nas primeiras fases de maturação do bago, sendo cada vez menor à medida que se aproxima do final da maturação (Dumazert *et al.*, 1973).

Czochanska *et al.* (1979), ao estudarem as castas (*Vitis vinífera* L.) Beaujolais e Siebel, verificaram que as maiores concentrações de taninos encontram-se no início dos primeiros estágios de desenvolvimento do bago, ocorrendo um acentuado decréscimo ao longo da maturação.

Lee e Jaworski (1989), estudaram durante dois anos consecutivos as castas Duchess, Niagara, Pinot blanc, Raval 51 e Seyval, verificando que a concentração em 3-flavanóis, procianidinas oligoméricas e seus galatos aumentou até à fase do pintor, notando-se um decréscimo contínuo até ao final da maturação.

Também Fernandez de Simón *et al.* (1992), obtiveram uma evolução semelhante à dos autores anteriores. As formas monoméricas, (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-galato, apresentaram um aumento dos seus valores até perto do pintor, seguindo-se uma diminuição, que foi mais acentuada à medida que o final da maturação de se aproximava.

De Freitas (1995), observou resultados semelhantes em duas castas tintas, Merlot e Cabernet-Sauvignon. Este autor verificou um decréscimo das procianidinas do tipo B e do trímero C₁ após o pintor.

Jordão *et al.* (1998), estudaram a influência da rega na composição fenólica das uvas da casta tinta Touriga Franca, e verificaram um aumento das (+) catequinas e (-) epicatequinas ao início do pintor, seguido de um decréscimo ao longo da maturação.

Estes resultados contrariam os relatados por Fernández de Simón *et al.* (1992), que verificaram o aumento destes compostos mas apenas até ao pintor.

Kennedy *et al.* (2001), observaram ao longo da maturação do cacho de uva, um aumento do grau médio de polimerização dos taninos da película.

Estes mesmos autores (2000 a,b), em dois trabalhos diferentes, encontraram um decréscimo do grau médio de polimerização nas grainhas durante a maturação.

No entanto, Geny *et al.* (2003), verificaram o contrário, pois o grau de polimerização dos taninos aumenta do pintor à maturação.

Mateus *et al.* (2001), ao estudarem a composição de proantocianidinas nas castas tintas, Touriga Nacional e Touriga Franca, na região do Douro durante a maturação em dois anos consecutivos, verificaram que o teor destes compostos diminuiu após o

pintor, havendo no entanto um incremento a meio da maturação seguindo-se um novo decréscimo no final desta, nas duas castas.

Jordão *et al.* (2001), avaliaram de que forma evoluem as proantocianidinas dos engaços ao longo da maturação, mostrando uma tendência para o decréscimo das proantocinidinas poliméricas ao longo para maturação para todas as castas em estudo (Castelão Francês, Touriga Franca e Viosinho). O mesmo se verificou nas fracções monoméricas e oligoméricas.

Por fim, Ó-Marques *et al.* (2005) estudaram a evolução dos taninos condensados de acordo com o seu grau de polimerização da grainha, polpa e película, nas uvas das castas Cabernet-Sauvignon e Tinta Roriz, ao longo da maturação, verificando uma tendência para o decréscimo das proantocianidinas, qualquer que seja o seu grau de polimerização para todos os constituintes do bago.

4.3 Evolução dos precursores de aroma ao longo da maturação

Os precursores glicosilados encontrados nas uvas, de acordo com vários estudos feitos ao longo da maturação, tendem a acumularem-se nas uvas.

Estudos feitos por Wilson *et al.*, 1984 e Günata *et al.*, 1985b mostraram que os precursores dos terpenóis aumentam com o desenvolvimento bago.

Estudos feitos sobre o carotenóides mostram um decréscimo deste ao longo da maturação dando origem aos norisoprenóides em C₁₃ que tendem a aumentar ao longo do tempo (Razungles *et al.*, 1993), conforme se verifica na figura seguinte.

Oliveira *et al.* (2004), estudaram a evolução dos carotenóides ao longo da maturação, confirmando o seu decréscimo à medida que os bagos amadurecem.

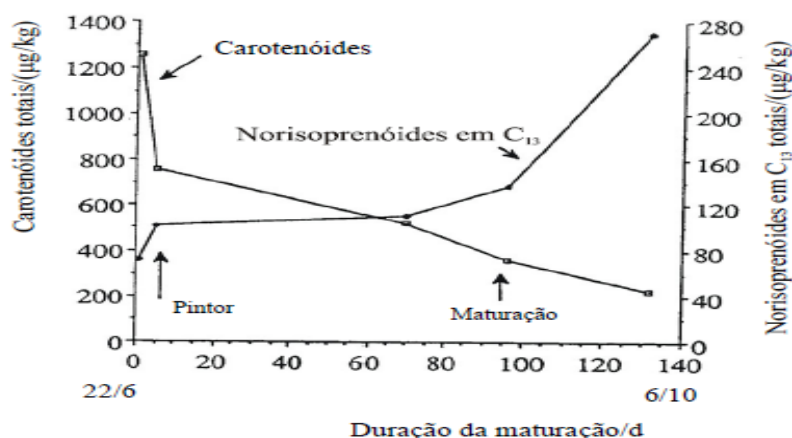


Figura 9: Evolução dos carotenóides e dos norisoprenóides em C₁₃ ao longo da maturação em uvas da casta *Muscat d'Alexandrie* (adaptado de Razungles *et al.*, 1993).

5. Factores agronómicos que influenciam o teor de compostos fenólicos e de precursores de aroma

Ao longo do tempo muitas têm sido as investigações levadas a cabo com intuito de avaliar os factores que influenciam os muitos compostos presentes no vinho. Factores esses relacionados com o clima, com o solo bem como factores agronómicos tais como a monda ou a desfolha.

A desfolha é uma prática que se insere nas intervenções em verde, e comparando videiras com está prática e videiras sem desfolha, observa-se que nas videiras que sofreram desfolha um aumento de taninos e de antocianinas (Andrade *et al.*, 2003).

Ó-Marques *et al.* (2005), ao estudarem o efeito da monda nas castas Cabernet Sauvignon e Tinta Roriz, comprando três modalidades (Testemunha, 50% de monda e 75% de monda) nas várias partes do cacho, verificaram diferenças nos valores de taninos condensados na modalidade testemunha e as outras duas modalidades. Isto é, na fracção polimérica das grainhas, películas e polpa da testemunha encontraram-se valores mais baixos.

Martins (2007), estudou o efeito da monda de cachos na casta Syrah, verificando que na modalidade mondada existia um aumento no teor de antocianinas e proantocianidinas. Este mesmo autor estudou o efeito da monda nos precursores G-G verificando o seu aumento ao longo da maturação. Estes resultados já tinham sido verificados por Iland *et al.* (1996) na casta Syrah.

Jordão *et al.* (1998), estudaram o efeito da rega na composição fenólica das uvas na casta Touriga Franca, verificando, que no que diz respeito às antocianinas totais, um valor mais baixo nas videiras sujeitas a maior teor de água. Em relação às proantocianidinas, foi na modalidade em que vinha foi regada, que se verificou um teor mais elevado nas grainhas e engaço.

Mateus *et al.* (2001) estudaram a influência da altitude na evolução das proantocianidinas, verificando que para altitudes mais baixas estes compostos assumem valores mais elevados.

Estes mesmos autores em 2002 estudaram a influência da altitude na síntese de antocianinas. Concluindo que nas zonas onde este parâmetro é mais elevado, os teores de antocianinas totais atingem valores mais elevados, em ambas as castas.

Ainda em relação ao efeito da altitude, num estudo feito por Regina *et al.* (2009), estudaram o impacto da altitude na qualidade das uvas, concluindo um teor mais elevado de antocianinas e fenóis totais nas vinhas mais altas.

Oliveira *et al.* (2004), estudaram o efeito de alguns parâmetros da viticultura nos carotenóides, esses parâmetros foram: exposição solar/sombra, altitude, altura da vegetação. Concluíram que uma menor exposição solar mostra um teor mais elevado em carotenóides nas castas Maria Gomes e Loureiro. No que diz respeito ao efeito da altitude, estes autores verificaram que em zonas mais altas os carotenóides assumiram valores mais altos. Nas uvas retiradas de videiras com vegetação mais elevada, encontraram valores mais elevados de carotenóides.

Farinha (2007) estudou a influência do sistema de condução no comportamento agronómico da casta Syrah, concluindo que é no Monoplano ascendente onde o valor de antocianinas é mais elevado

6. Objectivos do trabalho

Neste trabalho experimental pretendeu-se avaliar o impacto que a altitude tem no desenvolvimento dos compostos fenólicos e precursores de aroma ao longo da maturação em duas castas: Touriga Nacional e Touriga Franca, em duas quintas localizadas no Norte do país. Uma das quintas pertence ao Douro (Quinta Cova da Barca) e outra pertence à Beira Interior (Quinta do Cardo).

7. Material e Métodos

6.1 Caracterização da experiência

Este estudo foi levado a cabo em duas quintas: Quinta Cova da Barca situada no Douro Superior e Quinta do Cardo situada na Beira Interior (Sub-região de Figueira de Castelo Rodrigo).

6.1.1 Região demarcada do Douro e caracterização do local de ensaio

Esta região obteve a sua demarcação no tempo de Marquês de Pombal em 1756. Actualmente a sua área de plantação é de cerca de 250000ha localizada no Nordeste de Portugal, ao longo do Rio Douro numa extensão de 100 Km, desde de Barqueiros, na confluência das serras do Marão e de Montemuro, até Barca d'Alva, a nascente, na fronteira espanhola. As vinhas encontram-se nas encostas do Douro e seus afluentes - Corgo, Pinhão, Tua e Sabor na margem direita; Têdo, Távora, Torto, Teja e Côa, na esquerda – aumentando assim a incidência da radiação solar e as temperaturas, sempre muito elevadas no verão, nas cotas mais baixas e nos vales estreitos de rios e ribeiras.

Como é bem visível as diferenças mesoclimáticas existentes nesta região, influenciadas por diferentes altitudes, e até pelo maior ou menor afastamento do mar, a região foi dividida em três regiões: Baixo-Corgo, Cima-Corgo e Douro Superior.

No tema em estudo, recolheram-se amostras na Quinta Cova da Barca que se encontra na Sub-Região do Douro Superior.

Nesta Sub-região, o clima é tipicamente mediterrânico, quente e seco no verão, sendo este propício quer à produção de vinhos do Porto, quer a vinhos tintos de alta qualidade (Magalhães, 2008).

A Quinta Cova da Barca pertence ao concelho de Freixo de Espada à cinta, localizado na sub-região do Douro Superior. Esta quinta encontra-se na margem do rio Douro Internacional. A sua área total é de 49 ha dos quais 14ha dizem respeito à área de vinha plantada.

O encepamento da Quinta Cova da Barca é apenas de castas tintas, Touriga Nacional, Touriga Franca e Tinta Roriz. Ambas as castas a serem estudadas foram plantadas com um compasso de 2.3x1.1m, o porta-enxerto é o 1103P, apenas diferem no ano de plantação. A Touriga Nacional foi plantada em 2001 e a Touriga Franca em 2002.

Aqui o solo é de origem xistosa com afloramentos de calcário. A mobilização do solo é mínima, apenas se faz mobilização mecânica na entre linha. Sistema de rega de gota a gota com um débito de 4 litros por hora.

A quinta Cova da Barca encontra-se rodeada por cadeias montanhosas, com uma baixa altitude, cerca de 125m, que defendem a região de ventos húmidos provenientes do Atlântico, bem como de ventos frios e secos provenientes de Espanha, criando um enclave mediterrânico entre as terras frias.

6.1.2 Região demarcada da Beira Interior e caracterização do local de ensaio

Em 1999 foi criada a região demarcada da Beira Interior, sendo esta umas das regiões mais extensas do país, prolongando-se desde Figueira de Castelo Rodrigo a norte, na bacia do rio Águeda, afluente do rio Douro, até Castelo Branco e Vila Velha do Ródão, na margem esquerda do rio Tejo (Salvador, 2006).

Aqui os Invernos são rigorosos e longos e Verões quentes e secos com elevadas amplitudes térmicas e frequência de geadas. É um clima duro nas épocas extremas do ano, árido e difícil (Salvador, 2006).

Esta região está dividida em três sub-regiões: Pinhel, Figueira de Castelo Rodrigo e Cova da Beira.

No presente trabalho foram recolhidas amostras da Quinta Do Cardo na Sub-Região de Figueira de Castelo Rodrigo.

A Sub-Região de Figueira de Castelo Rodrigo, faz fronteira com a Sub-Região de Pinhel e com a sub-Região do Douro Superior, e está situada num planalto com uma altitude entre os 600m e os 700m. Esta encontra-se delimitada pelos vales do Douro, Côa e Águeda e pelos relevos das serras da Marofa, Vieira e Castelo Rodrigo. Esta região é seca, onde muito raramente a precipitação ultrapassa os 500mm. Apresenta grandes amplitudes térmicas, perto dos 20°C, o que significa Invernos muito frios com a possibilidade de ocorrência de geadas e Verões extremamente quentes, com temperaturas que chegam facilmente aos 40°C.

A Quinta do Cardo pertence ao concelho de Figueira de Castelo Rodrigo com uma altitude de 700m, e ocupa uma área de 161ha, dos quais 80 correspondem a área de vinha e 81 ha a plantação de floresta. As principais castas tintas desta quinta são a Touriga Nacional, a Touriga Franca e a Tinta Roriz, a principal casta branca é a Sória. O porta-enxerto, em ambas as castas em estudo é o 196.17 Cl.

Quadro 1: Caracterização das vinhas da Quinta do Cardo

	Castas	Compasso	Idade	Área parcial (ha)	Área Total (ha)	Vindima
Vinha Pombal	Tinta Roriz Tinta Franca Touriga Nacional	2.0x0.8m 2.0x0.8m 2.0x1.2m	1998	2.3 2.5 3.8	8.6	Mecanizada
Vinha Adega	Touriga Nacional Touriga Franca	2.3x1.0m 2.3x1.0m	2000	10.5 1.5	12.0	Mecanizada
Vinha Lomedo	Síria	3.0x1.0m	1985	7.4	7.4	Manual
Vinha do Forno	Touriga Franca	2.3x1.0m	2000 2001	6.0 10.0	16.0	Mecanizada
Vinha Estrada	Merlot	2.3x1.0m	2001	2.5	2.5	Mecanizada
Vinha Cão	Tinto Cão	2.3x1.0m	2001	1.3	1.3	Mecanizada
Vinha Castelo	Tinta Roriz Caladoque Alicante	2.3x1.0m	2001	17.0 2.0 2.0	21.0	Mecanizada
Vinha Capela	Síria Arinto Touriga Nacional Touriga Franca Tinta Roriz Mourisco Tinto Cão Rufete	2.5x1.0m	1992	2.0 2.35 3.0 1.19 0.5 2.5 0.25 0.3	12.09	Manual

6.2 Castas estudadas

No presente trabalho as castas a serem estudadas são a Touriga Nacional e Touriga Franca.

6.2.1 Touriga Nacional

A Touriga Nacional é uma casta originária no Dão, de acordo com um estudo recente feito por Martins *et al.* (2009).

Esta casta apresenta um cacho pequeno e medianamente compacto, com um bago também ele pequeno, uniforme e arredondado, apresenta uma cor negro-azul, cuja película é espessa, polpa não corada, mole e succulenta. É considerada uma casta de maturação média.

Os mostos aos quais dá origem apresentam um potencial alcoólico e uma acidez médios por vezes atingindo valores elevados.

Os vinhos da casta Touriga Nacional, apresentam uma elevada intensidade de cor (rubi fechado de tonalidade violácea). O aroma é complexo com notas bastante marcantes a frutos vermelhos (framboesa e cereja), frutos pretos (ameixa), frutos silvestres (amora) e floral (violeta). Mais recentemente encontraram-se outros aromas como é o caso da bergamota e laranja (Guedes de Pinho *et al.*, (2007).

Na boca apresenta-se cheio, encorpado, persistente, robusto, muito frutado, quando jovem. Possui um elevado potencial para envelhecimento prolongado adquirindo nessa altura, uma elegância, um aroma e sabor aveludados inconfundíveis.

6.2.2 Touriga Franca

De acordo com Truel (1984) a Touriga Franca (antigamente denominada de Touriga Francesa) tem a sua origem o norte de Portugal, não tendo esta uma relação com castas francesas.

Esta casta apresenta um cacho de tamanho médio e compacto, cujo bago apresenta tamanho médio, uniforme, de forma achatada a arredondada, a cor é negro azul, a película é medianamente espessa, polpa não corada, rija e pouco succulenta. É uma casta de maturação média a tardia.

Os mostos apresentam um potencial alcoólico e uma acidez médios.

Os vinhos possuem uma intensidade de cor elevada, cujo aroma mostra com alguma complexidade a frutos vermelhos (framboesa e cereja), frutos silvestres (amora), floral e ligeiramente herbáceo.

Os vinhos feitos de Touriga Franca têm um levado potencial no que diz respeito ao seu envelhecimento.

6.3 Metodologia analítica

Os parâmetros calculados neste trabalho estão descritos na tabela seguinte onde também vem mencionado o respectivo método.

A preparação da amostra foi feita através do método estabelecido por Carboneau e Champagnol (1993) (Ver anexo 1)

Quadro 2: Determinações analíticas e respectivo método

Determinações analíticas	Método
pH	Potenciometria (OIV, 1990)
Índice de polifenóis totais	Ribéreau-Gayon (1968)
Acidez Total	Titulação acidimétrica (OIV, 1990)
Álcool provável (°Brix)	Refractometria
Antocianinas Totais	Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965)
Taninos Condensados e suas características estruturais	Fractogel (Labarbe Tiólise (Monagas <i>et al.</i> (2003); Cosme <i>et al.</i> (2009))
Precusores de Aroma	G-G (Williams <i>et al.</i> , 1995b; Lland <i>et al.</i> (1996))
Intensidade da cor	Sudraud (OIV, 1990)
Tonalidade	Sudraud (OIV, 1990)

6.3.1 pH

A concentração hidrogeniônica do meio é dada pela expressão: $\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$. Para determinar o pH recorreu-se ao método da potenciometria, que se baseia na determinação da diferença de potencial entre um eléctrodo de referência com um potencial constante e conhecido e um eléctrodo de medida (método único da OIV, 1990).

6.2.2 Acidez Total

O método utilizado foi a titulação acidimétrica (NPI-2139), e tem como fundamento a neutralização dos ácidos por uma solução alcalina NaOH de concentração 0,1M, na presença de um indicador, neste caso, o azul de bromotimol. Os resultados obtidos são expressos em g/dm³ de ácido tartárico.

6.3.2 Teor de álcool provável

O método utilizado na determinação deste parâmetro foi a refractometria, recorrendo-se a um refractómetro de mão (método OIV, 1990). Os resultados são expressos em °Brix.

6.3.3 Índice de fenóis totais

O método utilizado foi o proposto por Ribéreau-Gayon (1968), e baseia-se na leitura da absorvância a 280 nm num espectrofotómetro, após uma diluição do mosto de 1/100 com água destilada. Os resultados são expressos em índice.

6.3.4 Antocianinas totais

O método utilizado na determinação das antocianinas totais foi o proposto por Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965). O procedimento deste método baseia-se em retirar um 1 mL de amostra preparada por champagnol para um tubo e adicionar 20 mL de HCl a 2% e 1 mL de álcool etílico com 0,1% de HCl. Deste preparado retira-se 10 mL para dois tubos, num coloca-se 4 mL de água e noutro 4 mL de bissulfito. Esperar 20 minutos e ler no espectrofotómetro a 520 nm. Este procedimento é feito em duplicado.

6.3.5 Taninos condensados e suas características estruturais

Para determinar as proantocianidinas optou-se por fazer um fraccionamento dos flavonóis numa coluna de Fractogel seguindo-se uma tiólise-HPLC-UV.

Fraccionamento dos flavanóis do bago em coluna de fractogel

Ao realizar este método pretende-se eliminar as antocianinas e outros flavonóides monoméricos e poliméricos que possam interferir no cromatograma e consequentemente na quantificação dos flavanóis e respectivos benziltio-éteres.

O fraccionamento em coluna de Fractogel foi desenvolvido de acordo com o método descrito por Labarbe (2000).

Numa coluna de vidro da QuickFit CR 12/10 de (100x10), cheia de fractogel TSK HW – 40F, fez-se passar 4 mL de extracto de película a um débito de 0,7 mL/min, sendo este mantido por uma bomba de vácuo (Vacuunbrand), modelo MZ2C.

Uma mistura de etanol/água/TFA (solvente A) com concentrações de (55:45:0,05, V/V/V) permite o acondicionamento da coluna antes de incorporar os 4 mL do extracto, sendo o volume adicionado de 30 mL.

Este solvente permite então a eluição dos fenóis simples e flavonóides monoméricos (ácidos fenólicos, antocianinas, flavonóis, estilbenos e catequinas), e ainda poliméricos por ordem crescente do seu grau de polimerização.

Após a passagem da amostra adiciona-se novamente 30 mL do solvente a fim de recuperar a fracção monomérica. Findo a passagem deste solvente a coluna é lavada com 30 mL de acetona/água (60:40, V/V) (solvente B) a fim de recolher os flavonóides poliméricos que ainda estão fixos no gel.

Esta última fracção é evaporada até à secura, diluída em 1 mL de metanol e conservada a - 20°C. Sendo depois tolisada e analisada em HPLC-UV.

Determinação dos taninos condensados e suas características estruturais por tiólise-HPLC-UV

O método utilizado é baseado na ruptura das ligações interflavânicas, catalisada em meio ácido na presença de tolueno- α -thiol. A tiólise permite distinguir as unidades de extensão (na forma de derivados benziltioéteres) e as unidades terminais (na forma de flavonóis livres) das proantocianidinas. Ambas as formas foram quantificadas a 280 nm a partir de curvas de calibração encontradas através dos flavan-3-óis standart ((+) catequina, (-) epicatequina, (-) epigalhocatequina e (-) epicatequina-3 galato). (ver Anexo 2) A (-) epicatequina foi quantificada na curva da (+) catequina, e os adutores do tolueno foram quantificados nas rectas das unidades livres.

Na preparação da amostra juntam-se 100 μ L da amostra, previamente preparada em coluna de fractogel, a 100 μ L de tolueno- α -thiol num tubo de 1,0mL com tampa de rosca. Agita-se esta mistura, e em seguida, coloca-se num banho de água a 55°C durante 7 minutos. Terminado este tempo a amostra já tiolisada é arrefecida durante 1 minuto num copo de vidro com água à temperatura ambiente, e analisada em HPLC, sendo o volume de injeção de 10 μ L.

O equipamento utilizado na análise é um sistema de cromatografia líquida onde se utilizou uma bomba Merck Hitachi L-7100 e um detector Waters 2487 com dois canais de absorvência.

Os produtos resultantes da tiólise são separados numa coluna Gemini C18 110A (150X3mm/5µL), e protegida por uma pré-coluna de características idênticas. Esta coluna permite assim obter os resultados em apenas 18 minutos (Monagas *et al.* (2003), Cosme *et al.* (2009)).

6.3.6 Precusores glicosilados

Para ambas as castas, foi doseado o teor de Precusores de Aroma, pelo método G-G, descrito por Williams *et al.*, (1995b); Iland *et al.* (1996) dividindo-se em três fases: Extração dos precusores, Hidrólise ácida e Dosagem enzimática da Glucose.

Extração dos precusores de Aroma:

- **Preparação do ensaio:** Pesar 50 bagos e homogeneizar. Retirar 2 g para tubos de centrifuga (em duplicado) e adicionar 10 mL de etanol a 50%. Agitar regularmente durante uma hora. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 min. Retirar 4 mL do sobrenadante para um balão volumétrico de 50 mL e adicionar 36 mL de água destilada e uma gota de HCl a 5M
- **Preparação do Sep-Pak:** Passar totalmente, pelo Set-Pak, 10 mL de metanol mais 10 mL de água destilada
- **Isolar os Glicósidos:** Passar o ensaio pelo Set-Pak, com fluxo 1-2 minutos. De seguida, lavar o Set-Pak com 30 mL de água destilada, mais 10 mL de água destilada mais 10 mL de água destilada.
- **Eluição dos Glicósidos:** Pipetar 1,5 mL de etanol a 50%, mais 3mL de água destilada para o Set-Pak e recolher em balões volumétricos de 5mL. Ajustar o volume com água destilada

Hidrólise ácida:

- **Preparação do controlo e da amostra:**

Controlo: pipetar 1 mL do eluido e mais 2mL de água destilada, para um tubo de 5mL e agitar cuidadosamente

Amostra: pipetar 1 mL de eluído e mais 2mL de H₂SO₄ a 2,25 M, para um tubo de 5 mL e agitar cuidadosamente.

- **Hidrólise para libertar a Glucose:**

Controlo: deixar à temperatura ambiente durante uma hora

Amostra: colocar em banho Maria a 100°C durante uma hora. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente

Dosagem enzimática da Glucose:

- **Neutralização a pH 8 e ajustar o volume a 5mL:**

Controlo: pipetar para balões volumétricos e ajustar o volume.

Amostra: Adicionar 0,8 mL de NaOH a 8,8M e ajustar o pH a 8 com NaOH a 0,1M ou H₂SO₄ a 1M. Ajustar o volume a 5 mL em balões volumétricos.

- **Tratamento para remover as interferências:**

Controlo: Lavar o Set-Pak com 10 mL de metanol, mais 10 mL de água destilada. Em seguida passar o controlo pelo Set-Pak e recolher em tubos.

Amostra: Lavar o Sep-Pak com 10 mL de metanol, mais 10 mL de água destilada. Em seguida passar a amostra pelo Sep-Pak e recolher em tubos.

- **Análise da Glucose**

Controlo: pipetar 1mL de controlo para um tubo+1mL de água destilada+1 mL da solução 1 do kit. Agitar cuidadosamente

Amostra: pipetar 1mL de amostra para um tubo adicionar 1 mL de água destilada e 1mL da solução do kit 1. Agitar cuidadosamente

Após 5 minutos ler no espectrofotómetro a 340 nm. Adicionar 20µL da solução 2 do kit e agitar. Ler novamente após 20 min.

6.3.7 Intensidade e tonalidade da cor

O método utilizado foi o de Sudraud (método usual da OIV, 1990), segundo este é necessário fazer 3 leituras no espectrofotómetro a 420nm, 520nm e 620nm, em células de 1 mm, do líquido obtido através do método de champagnol (1993). A intensidade é obtida através da soma resultante das três leituras a tonalidade consiste no quociente entre as leituras da Absorvência a 420nm e Absorvência a 520nm. Os resultados são expressos em unidades de absorvência (ua).

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$T = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

6.3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos nas análises laboratoriais foram tratados de acordo com a análise de variância (ANOVA) no programa excel, para um valor de $p < 0.05$, comparando-se assim o efeito das diferentes altitudes.

A análise estatística foi feita tendo em conta a influência da altitude ao longo da maturação bem como na altura da vindima, logo encontram-se pontos nos gráficos com duas letras.

7. Resultados e Discussão

7.1 Evolução da maturação

Quadro 3: Rendimento em ton/ha à vindima nas castas Touriga Nacional e Touriga Franca

	Touriga Franca (Ton/ha)	Touriga Nacional (Ton/ha)
Quinta Cova da Barca	3	5
Quinta do Cardo	3	6

Em ambas as castas, nas duas parcelas em estudo, verifica-se de forma geral o esperado no que diz respeito ao peso dos bagos, ou seja no decorrer da maturação o bago aumenta o seu peso e o seu volume. No entanto verificou-se alguns decréscimos ao longo da maturação dos bagos, no caso da Quinta Cova da Barca, este facto poderá indicar algum stress hídrico uma vez que esta quinta se encontra numa região extremamente quente.

Ao analisar os restantes parâmetros (pH, acidez total e °Brix) nos quadros seguintes verifica-se que estes evoluem de forma esperada. Com o aumento da acumulação de açúcar nos bagos, o °Brix aumenta ao longo do período de maturação para ambas as castas, consequentemente com este aumento, aumenta também o teor de álcool provável. A acidez total diminui bruscamente logo após o pintor, seguindo-se uma diminuição gradual. O valor do pH está inversamente relacionado com o da acidez total, isto é, este valor aumenta com a diminuição do valor da acidez total, sendo esta facto verificado para ambas as castas.

Touriga Franca

Quadro 4: Controlo de maturação das uvas da casta Touriga Franca recolhidas na Quinta Cova da Barca

Dias após pintor	pH	Acidez total (mg ác.tartárico/L)	°Brix	Peso de 100 bagos (g)	Volume ocupado por 100bagos(mL)
0	2,70	35,6	6,3	115,2	100
10	2,84	13,7	10,4	147,5	120
20	3,28	8,7	14	188,1	166
30	3,78	4,1	16,9	211,5	186
40	3,81	4,0	17,7	197,4	170
50	3,84	4,2	18,7	234,9	266
60	3,87	4,3	22,9	197,5	180
70	4,01	4,2	23,2	221,6	196

Quadro 5: Controlo da maturação das uvas da casta Touriga Franca recolhidas na Quinta do Cardo

Dias após pintor	pH	Acidez total	°Brix	Peso 100 bagos (g)	Volume ocupado por 100 bagos (mL)
0	2,46	40,4	5,4	81	80
10	2,93	12,8	13,9	125	127
20	3,47	6,3	16,2	156	160
30	3,28	6,5	18,8	158	167
40	3,53	4,6	20,1	167	180
50	3,59	4,4	22,1	170	184

Touriga Nacional

Quadro 6: Controlo da maturação das uvas da casta Touriga Nacional recolhidas na Quinta Cova da Barca

Dias após pintor	pH	Acidez total (mg ác.Tartárico/L)	° Brix	Peso de 100 bagos(g)	Volume ocupado por 100 bagos (mL)
0	2,59	39,8	5,8	89	73
10	2,65	22,9	9,2	97	97
20	2,97	12,7	13	119	100
30	3,27	9,6	16,4	126	120
40	3,66	4,2	18,3	133	137
50	3,51	5,3	20,9	156	167
60	3,05	5,2	22,8	115	133
70	3,98	3,8	23,5	128	136

Quadro 7: Controlo da maturação das uvas da casta Touriga Nacional recolhidas na Quinta do Cardo

Dias após pintor	pH	Acidez total	°Brix	Peso 100 bagos (g)	Volume ocupado por 100 bagos (mL)
0	2,52	36	4,7	63	67
10	2,8	14,9	13,8	123	133
20	3,13	8,6	16,3	129	137
30	3,63	6,2	22,4	153	169
40	3,25	5,1	20,7	131	134
50	3,42	4,4	23,9	167	176

7.2 Influência da altitude

Nos resultados que se seguem, o factor em estudo parece ter influência na síntese dos compostos analisados, isto porque as diferenças de altitude pressupõem condições climáticas diferentes. Uma altitude mais elevada apresenta uma temperatura e uma humidade relativa menor que numa altitude mais baixa.

7.2.1 Antocianinas

Na figura que se segue, onde se pretende avaliar a influência da altitude nas antocianinas na casta Touriga Franca

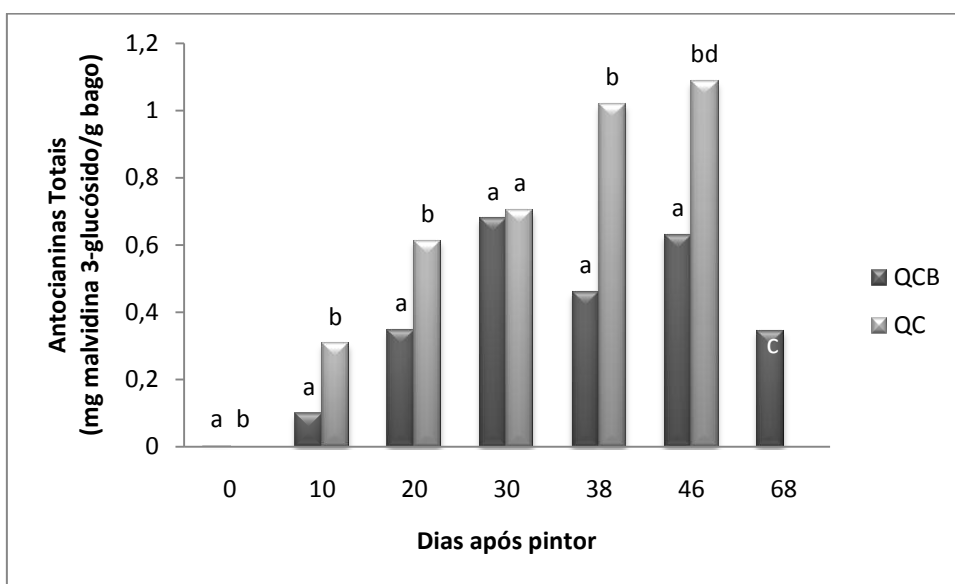


Figura 10: Influência da Altitude nas Antocianinas na casta Touriga Franca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

Ao longo da maturação é bem visível um acréscimo gradual no teor de antocianinas totais, verificando-se no entanto, no caso da Quinta Cova da Barca, um decréscimo ao meio da maturação e um novo decréscimo já no final. Ocorreu então um decréscimo de acumulação de antocianinas que, de acordo com Buttrose et al., 1971, está relacionado com as elevadas temperaturas sentidas neste local, sendo mais altas que as sentidas na Quinta do Cardo.

Esta tendência de aumento da concentração de antocianinas nos bagos desde o pintor até à vindima, está coerente com as referências encontradas na bibliografia (Jordão et al., 1988; Mateus et al., 2002; Pereira, 2008)

Comparando os valores obtidos neste trabalho com os valores encontrados na bibliografia verificam-se algumas diferenças.

No caso da Touriga Franca verifica-se que na QCB o valor de antocianinas totais ao longo da maturação é inferior ao encontrado por Jordão et al. (1998), sendo este à

vindima 0.34 mg malvidina 3-glicósido/g bago inferior aos 0.645 mg malvidina 3-glucósido/g bago verificado por este autor.

Em relação ao factor altitude verificam-se diferenças ao longo da evolução dos bagos. Diferenças essas que são significativas de acordo com o programa estatístico utilizado. Inicialmente o valor de antocianinas é superior na QCB ao valor obtido na QC. No entanto ao longo da maturação há uma tendência para as antocianinas da QC serem superiores às da QCB, havendo apenas uma altura em que os valores não são significativamente diferentes, cerca de 30 dias após o pintor.

Analisou-se também se os valores de antocianinas à vindima nas duas quintas eram ou não estatisticamente diferentes, verificando-se que eram de facto valores com diferenças significativas para o valor de p em estudo.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos num trabalho sobre o tema em questão de Mateus *et al.* (2002). Estes autores verificaram que o factor altitude é muito vantajoso para uma maior acumulação das antocianinas nos bagos, especialmente nas uvas de TN. Esta última conclusão difere do estudo em questão, pois é a TF que assume um valor mais elevado no que diz respeito à acumulação das antocianinas.

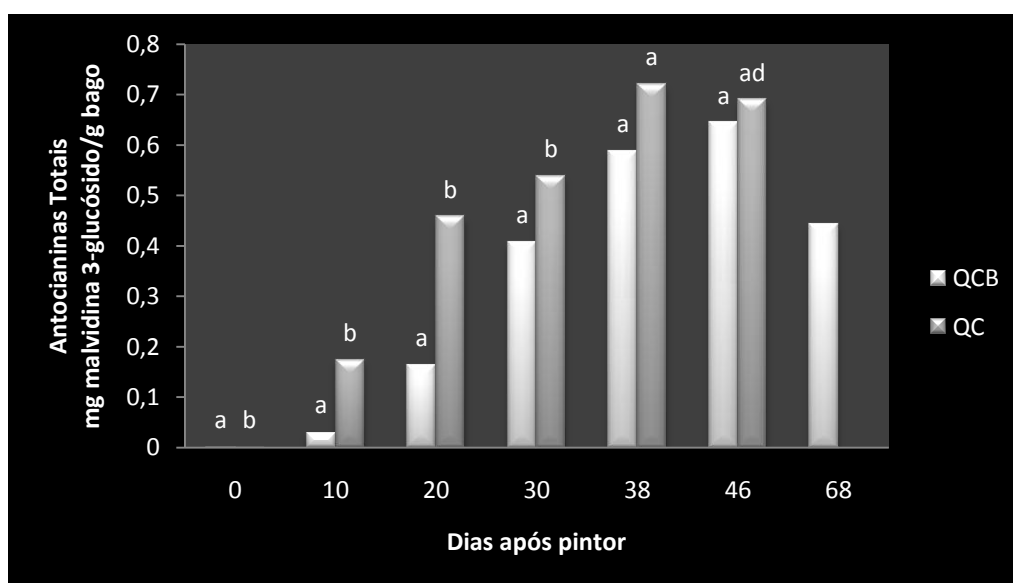


Figura 11: Influência da Altitude nas Antocianinas totais na casta Touriga Nacional (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0,05$)

7.2.2 Intensidade da cor

Na figura seguinte, avalia-se o impacto da altitude na intensidade da cor ao longo da maturação na casta Touriga Franca, verificando-se que este parâmetro tende a aumentar ao longo do tempo, diminuindo na QCB no final da maturação coincidindo com o decréscimo de antocianinas.

Comparando este parâmetro nas duas quintas verifica-se que este é mais elevado na QC, e cujos valores são significativamente diferentes. Uma explicação possível para estas diferenças poderá ser devido às grandes amplitudes térmicas sentidas na alta altitude (QC), ou seja dias muito quentes e noites frias.

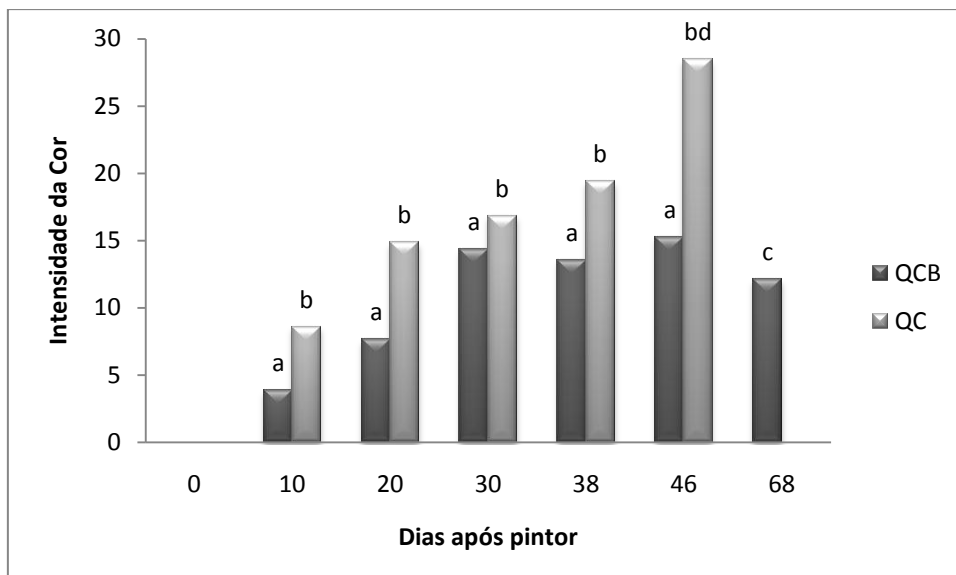


Figura 12: Influência da Altitude na Intensidade da cor na casta Touriga Franca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

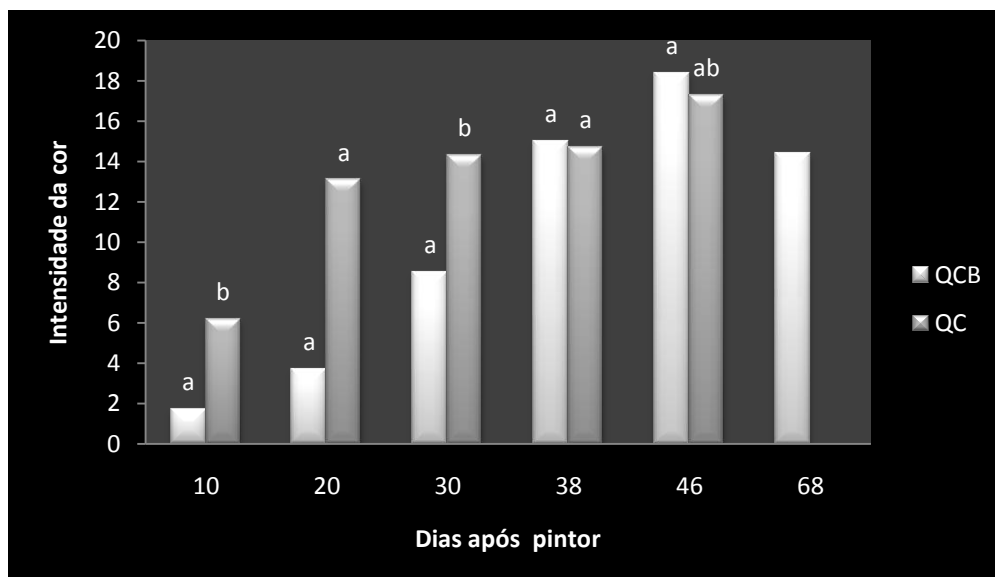


Figura 13: Influência da Altitude na Intensidade da cor na casta Touriga Nacional (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

7.2.3 Índice de Fenóis Totais

Ao longo da maturação, é bem visível em ambas as castas e ambas as quintas, há uma variação do valor dos fenóis totais. Estas variações coincidem com os aumentos e decréscimo sentidos nos valores de antocianinas e proantocianidinas.

No que diz respeito ao efeito da altitude na casta Touriga Franca verificam-se algumas diferenças, ainda que em algumas alturas não sejam significativas. Antes do pintor e logo a seguir este índice é superior na QCB. No decorrer da maturação esta situação inverte-se, passando o valor de IFT a ser superior na QC seguindo essa tendência até ao final da maturação.

Na amostragem à vindima, encontram-se valores com diferenças significativas, coincidindo assim com os resultados obtidos por Regina *et al.* (2009)

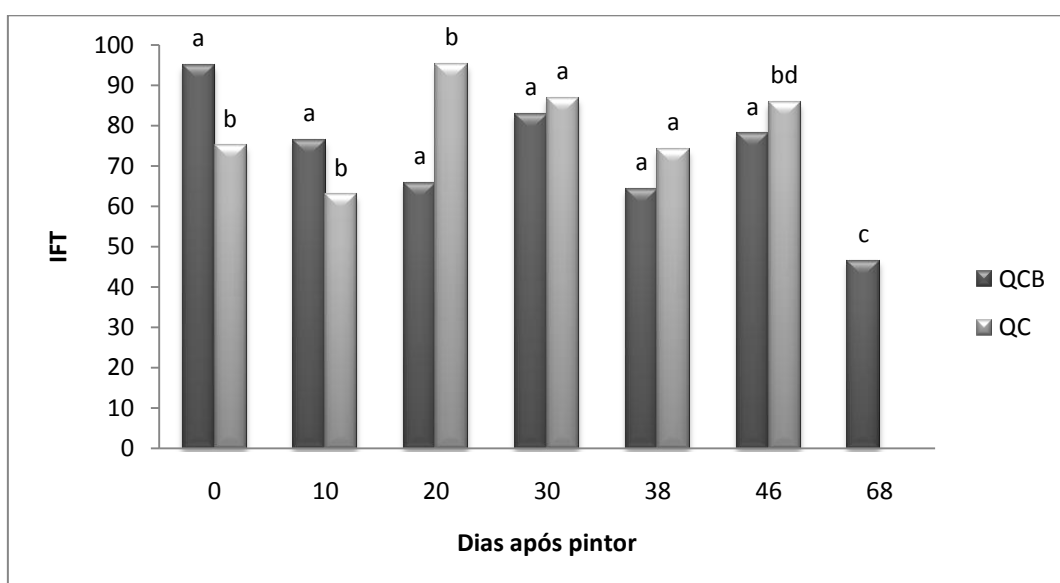


Figura 14: Influência da Altitude nos IFT na casta Touriga Franca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

Em relação à Touriga Nacional não se verifica, o mesmo que na TF, pois ao longo da maturação, há um maior índice de fenóis totais na baixa altitude que na alta altitude, exceptuando a meio da maturação e à vindima.

Na amostra recolhida à vindima, os valores de IFT nas duas quintas assumem valores com diferenças significativas, sendo este valor mais elevado na Quinta do Cardo, o mesmo foi verificado por Regina *et al.* (2009).

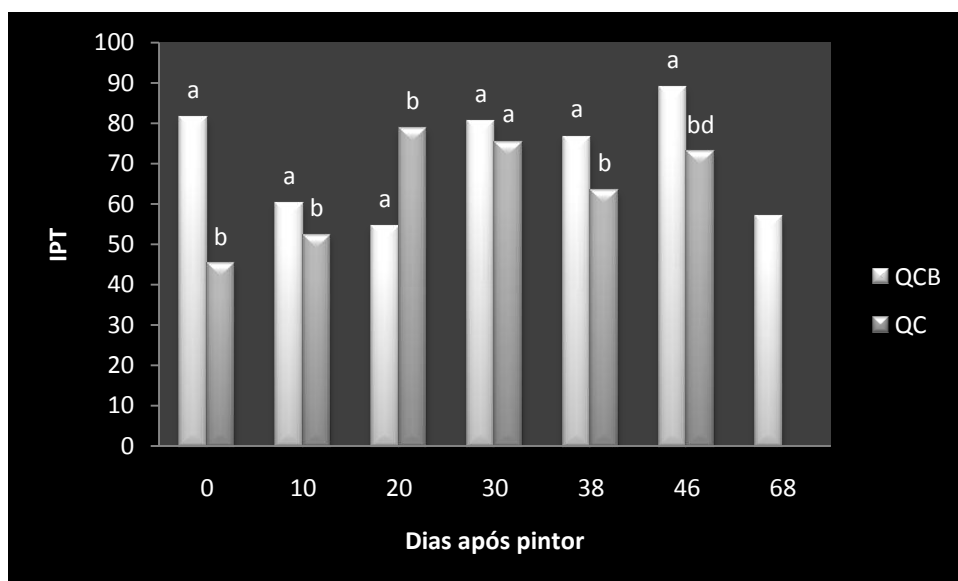


Figura 15: Influência da Altitude nos IFT na casta Touriga Nacional (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

7.2.4 Análise química detalhada das proantocianidinas do bago

7.2.4.1 Grau médio de polimerização das proantocianidinas (mDP)

Na análise das duas figuras seguintes referentes à evolução do Grau médio de polimerização nas castas Touriga Franca e Touriga Nacional ao longo da maturação dos bagos, encontram-se resultados que vão de encontro aos relatados noutros trabalhos. Isto é, e acordo com Kennedy *et al.* (2001) o mDP das películas tende a aumentar ao longo do tempo, este facto foi também verificado por Moutinho-Ferreira (2006), verificando-se que nas duas castas há uma tendência para isso acontecer, notando-se algumas variações.

À vindima, Moutinho-Ferreira (2006), verificou que o mDP das películas era de 25 já as grainhas um mDP de 8. O mesmo verificaram Kennedy *et al.* (2000 a,b) no que diz respeito às grainhas, cujo mDP se aproxima do anterior. Também Vicens (2007) na casta Syrah mostrou que o grau médio de polimerização das películas se encontrava perto dos valores de Moutinho-Ferreira (2006), correspondendo este valor a 30.

Kennedy *et al.* (2000), mostraram que o mDP dos bagos à vindima era de 5.6, sendo este um valor mais baixo quando comparado com as duas castas em estudo, como é possível verificar nas figuras 16 e 17.

Quando se analisa o factor altitude, apesar dos resultados não serem significativamente diferentes para o um $p < 0.05$, há diferenças ao longo da maturação. No caso da Touriga Franca, antes do pintor é visível que na QC o mDP dos bagos é

superior ao da QCB, sendo esta situação contrariada ao longo do tempo. No final da maturação este valor é praticamente igual nas duas quintas.

No caso da Touriga Nacional, há uma clara tendência para o mDP dos bagos ser superior na QC ao longo a maturação, apenas no final desta se verifica o inverso, passando a QCB a ter uma maior mDP, tendência que se mantém até à vindima.

Comparando ainda o grau médio de polimerização mas entre a mesma casta, verifica-se que a TF na QCB, tende a assumir um valor superior ao da TN, ao contrário da QC pois a TF tem um menor mDP que a TN.

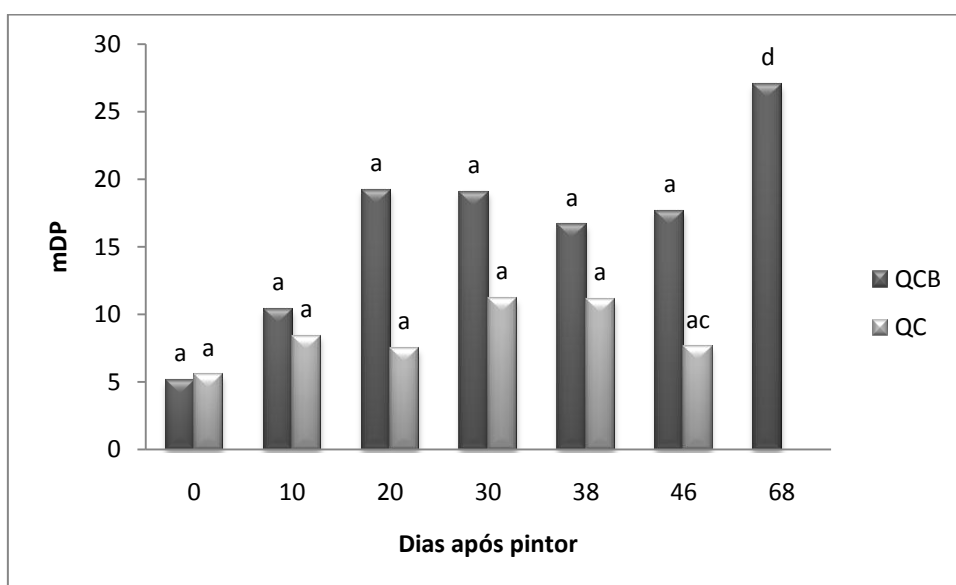


Figura 16: Influência da Altitude no mDP das proantocianinas em bagos na casta Touriga Franca nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

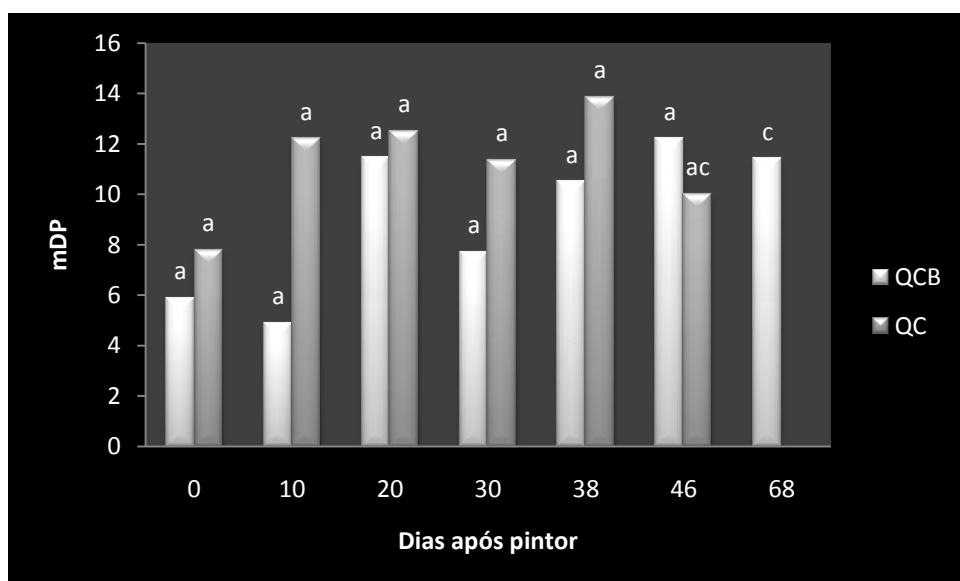


Figura 17: Influência da Altitude no mDP das proantocianinas na casta Touriga Nacional nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

7.2.4.2 Percentagem de esterificação pelo ácido Gálico nas unidades monoméricas das Proantocianidinas (%g)

Ao longo da maturação dos bagos, verifica-se uma diminuição da percentagem de esterificação pelo ácido Gálico nas unidades monoméricas das proantocianidinas, notando-se, no entanto algumas oscilações.

No final da maturação, em ambas as castas e em ambas as quintas, verificam-se de %g nos bagos valores abaixo dos 6%. Comparando com os valores encontrados na bibliografia encontram-se algumas diferenças, Prieur *et al.* (1994) verificaram que o valor de %g nas grainhas varia 13 e 30%. Estes resultados também foram verificados por Cosme *et al.* (2009), verificando que nas grainhas %g varia entre 16 e 20%. Estes valores encontram-se acima dos encontrados em ambas as castas, exceptuando no início da maturação. Em 1996 Souquet *et al.*, mostraram que a percentagem de esterificação com o ácido Gálico nas películas é mais baixa variando entre 2,7 e 6,0 aproximando-se dos valores obtidos, como é possível verificar nas seguintes figuras. Cosme *et al.* (2009), verificaram resultados semelhantes, pois %g varia entre 3.6 e 4.3%.

Comparando a influência da altitude na % de esterificação com o ácido gálico há uma tendência para esta ser superior na baixa altitude, ainda que as diferenças não sejam significativas, sendo esta situação é verificada em ambas as castas em estudo.

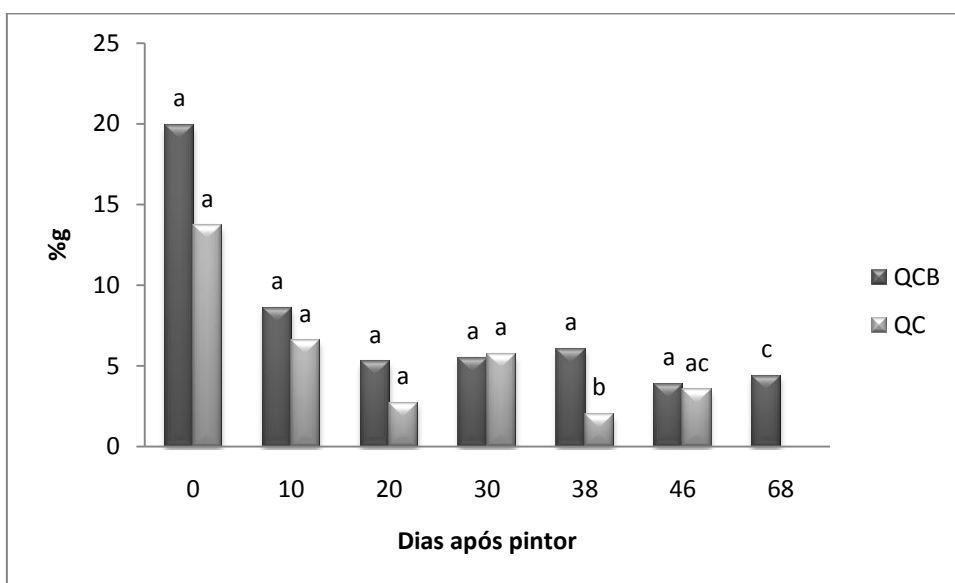


Figura 18: Influência da Altitude na Percentagem de esterificação pelo ácido Gálico nas unidades monoméricas das Proantocianidinas na casta Touriga Franca nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

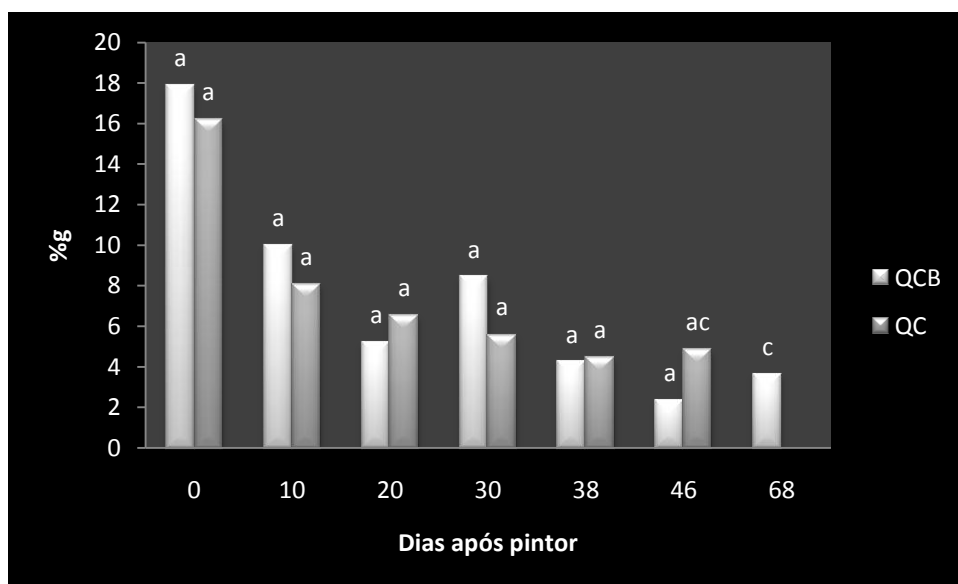


Figura 19: Influência da Altitude na Percentagem de esterificação pelo ácido Gálico nas unidades monoméricas das Proantocianidinas na casta Touriga Nacional nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

7.2.4.3 Percentagem de Prodelphinidinas nos taninos condensados (%p)

Analisando as duas figuras seguintes, verifica-se que ao longo da maturação a percentagem de Prodelphinidinas nos taninos condensados tende a aumentar ao longo da maturação conforme foi verificado por Souquet *et al.* (2000) e Monagas *et al.* (2003).

Ao comparar os valores obtidos em ambas as castas, verifica-se que estão se encontram dentro dos valores citados na bibliografia. De acordo com Cosme *et al.* (2009) a percentagem de prodelphinidinas nos taninos condensados foi de 28% na casta Touriga Nacional, 41.8% na casta Cabernet Sauvignon e 30.5% no Castelão, isto para as películas. Ao observar os resultados à vindima, verifica-se que é na Touriga Franca que os valores de %p são superiores e até perto dos encontrados na Touriga Nacional por Cosme *et al.* (2009). Verifica-se o mesmo quando se compara com a Touriga Nacional em estudo, pois os valores encontrados são da mesma ordem de grandeza com os citados por estes autores, como é possível ver nas figuras que se seguem. No que diz respeito ao efeito da altitude, é visível a existência de diferenças ainda que não sejam significativas.

É na Quinta Cova da Barca, em ambas as castas, que este parâmetro assume um valor mais elevado, ainda que até 10 dias após o pintor, ocorrendo o contrário no restante período da maturação.

Na amostragem tirada à vindima, a %p assumo um valor mais elevado na Quinta do Cardo, ainda que não tenha expressão estatística.

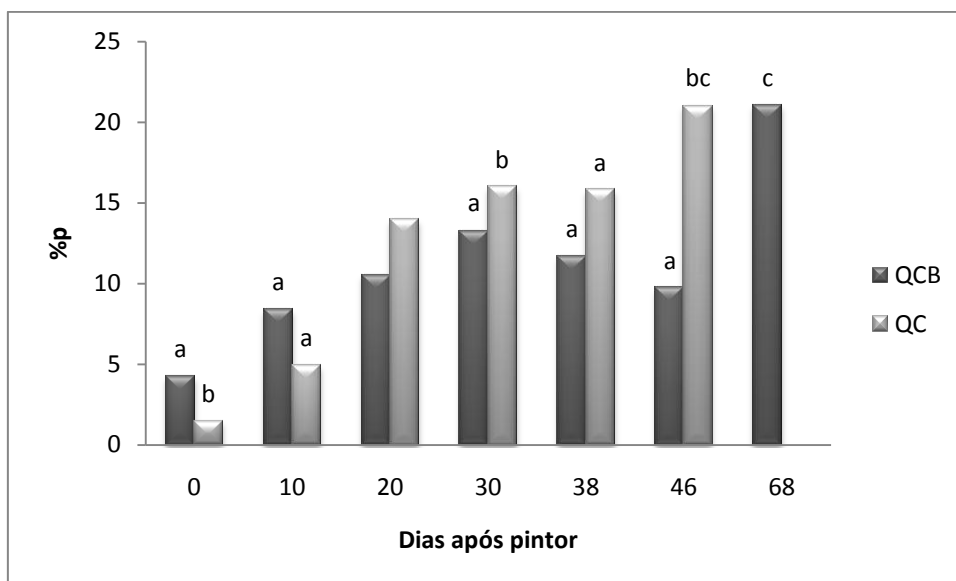


Figura 20: Influência da Altitude na percentagem de Prodelfinidinas nos taninos condensados na casta Touriga Franca nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

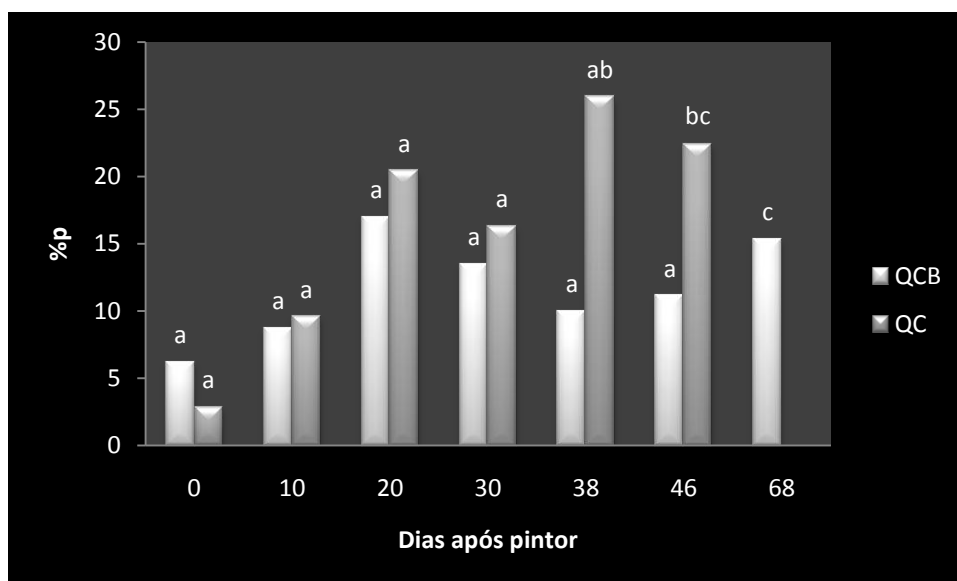


Figura 21: Influência da Altitude na Percentagem de Prodelfinidinas nos taninos condensados na casta Touriga Nacional nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não haver diferenças entre si para um $p < 0.05$)

7.2.4.4 Teor de Proantocianidinas do bago

No decorrer da maturação as proantocianidinas em regra há um decréscimo destes compostos ao longo da maturação Jordão *et al.* (1998), Mateus *et al.* (2001), Ó-Marques *et al.* (2005), no entanto, nas castas em estudo verificam-se algumas oscilações no decorrer da maturação.

Inicialmente as proantocianidinas tendem a aumentar seguindo-se um decréscimo a meio da maturação, como possível observar nas duas seguintes figuras. Esta evolução foi verificada por Hanlin and Downey (2009), ao estudarem como se comportam os taninos condensados ao longo da maturação dos cachos, nas castas Syrah e Cabernet Sauvignon. Estes autores verificaram que os valores de proantocianidinas oscilam ao longo da maturação, havendo um acréscimo mesmo no final da maturação.

Estes autores encontraram valores de proantocianidinas nas castas Caberbet-Sauvignon e Syrah entre 1-2 mg/g bago ao comparar com as castas em estudo verificam-se semelhanças à vindima. No caso da Touriga Franca o teor de proantocianidinas está entre 4-6 mg/g bago e no caso da Touriga Nacional entre 1,5-2 mg/g bago, como é possível verificar nas figuras 22 e 23. Também Sevinete-Pinto (2002), encontrou resultados na mesma ordem de grandeza que os anteriores, pois o valor das proantocianidinas na Touriga Nacional foi de 0.8mg/g bago e na Touriga Franca foi de 0,7 mg/g bago.

No que diz respeito ao tema em estudo, o efeito da altitude, verifica-se que nos locais de mais baixa altitude o teor em proantocianidinas é superior comparando com os resultados da alta altitude, este resultados vão de encontro aos encontrados por Mateus *et al.* (2001).

Apenas na amostragem à vindima se verifica a situação contrária, isto é, o valor de proantocianidinas superior na QC, sendo essas diferenças significativas apenas na casta Touriga Franca.

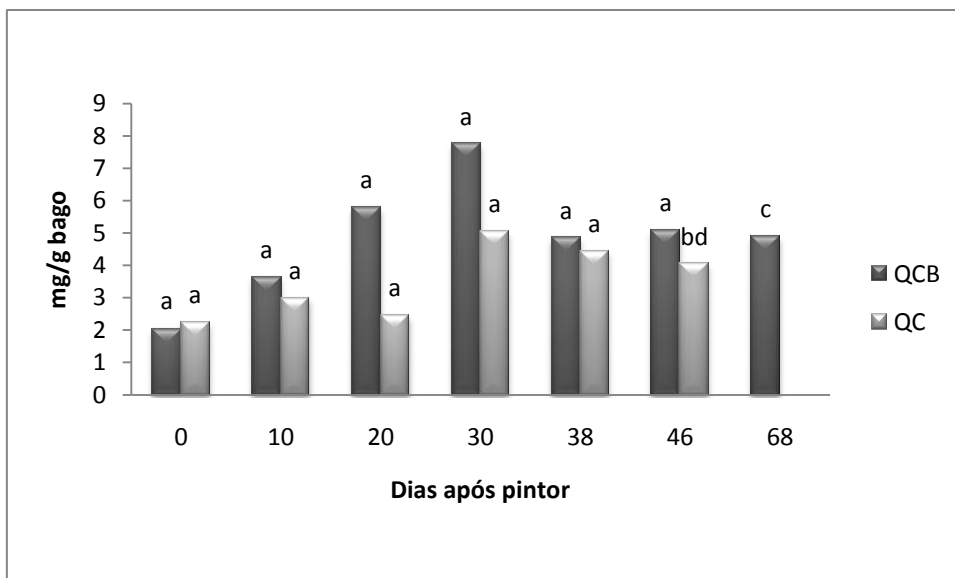


Figura 22: Influência da Altitude nas proantocianidinas na casta Touriga Franca (médias com a mesma letra indicam não existir diferenças entre si para um $p < 0.05$)

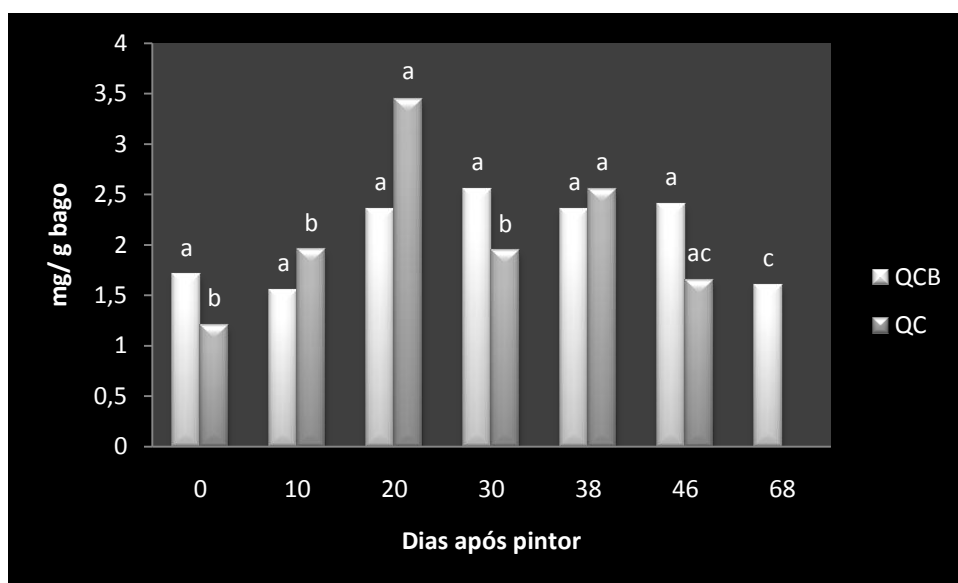


Figura 23: Influência da Altitude nas proantocianidinas na casta Touriga Nacional (médias com a mesma letra indicam não existir diferenças entre si para um $p < 0.05$)

7.2.5 Precursores de aromas

Analisando as duas figuras seguintes verifica-se que os precursores glicosilados de aroma tendem a aumentar ao longo do período de maturação, conforme foi verificado por Wilson *et al.* (1994) e Günata *et al.* (1995b).

O mesmo verificou Bayonove (1993), em relação aos terpenóis ligados quando estudou a evolução destes compostos ao longo da maturação nas uvas Muscat.

Em 1996, Gholami *et al.*, compararam a evolução dos precursores glicosilados com o aumento do °Brix, verificando que estes compostos aumentam com o aumento do °Brix.

Estes valores são confirmados por Razungles *et al.* (1993), quando estudaram a evolução dos carotenóides e dos norisoprenóides em C₁₃ ao longo da maturação na casta Muscat d' Alexandrie. Estes autores verificaram que os carotenóides tendem a diminuir ao longo da maturação, verificando-se um aumento dos norisoprenóides em C₁₃.

No quadro 7, encontram-se os valores de precursores de aroma à vindima, em µmol/bago, onde é possível verificar que a Touriga Nacional apresenta valores entre 1,9-2,1 µmol/bago e a Touriga Franca entre 0,5-1,6 dependendo do local de recolha da amostra. Comparando estes valores com os valores encontrados por Santos (2007), verifica-se no caso da Touriga Nacional resultados semelhantes (6,3-6,4 µmol/bago), ainda no caso em estudo seja um pouco mais baixo. Lland *et al.* (1996), verificou na casta Syrah valores entre 0,6-1,8 µmol/bago. O mesmo verificou Martins (2007), na casta Syrah, encontrando valores entre 0,6-1,2 µmol/bago. Estes valores aproximam-se dos encontrados para ambas em castas em estudo.

Quando se avalia as diferenças relativamente à altitude, verifica-se que aparentemente é na vinha com mais altitude que estes compostos assumem o valor mais alto. Havendo no entanto, à vindima uma alteração desta tendência, uma vez que os precursores de aroma são superiores na baixa em ambas as castas.

O mesmo verificaram Oliveira *et al.* (2004), quando estudaram a influência da altitude nos carotenóides, pois observaram que em geral estes compostos apresentavam valores mais elevados nos locais onde a vinha era mais alta.

Quando se compara a Touriga Nacional com a Touriga Franca, verifica-se que é na primeira casta que os precursores assumem um valor mais elevado, o mesmo verificou Sousa (2010), quando comparou o impacto dos sistemas de condução sobre os precursores de aroma.

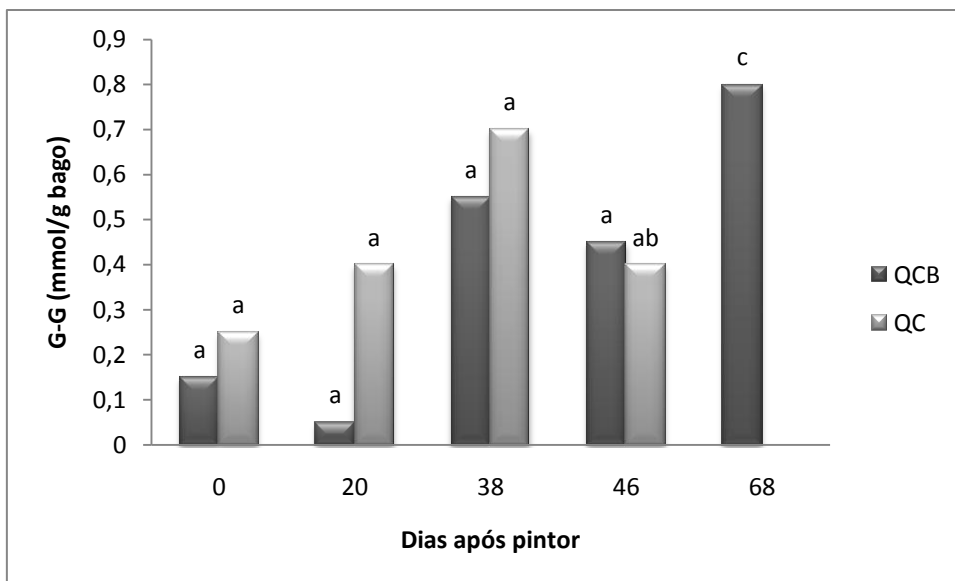


Figura 24: Influência da Altitude nos precursores de aroma em bagos na casta Touriga Franca nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não existir diferenças entre si para um $p < 0.05$)

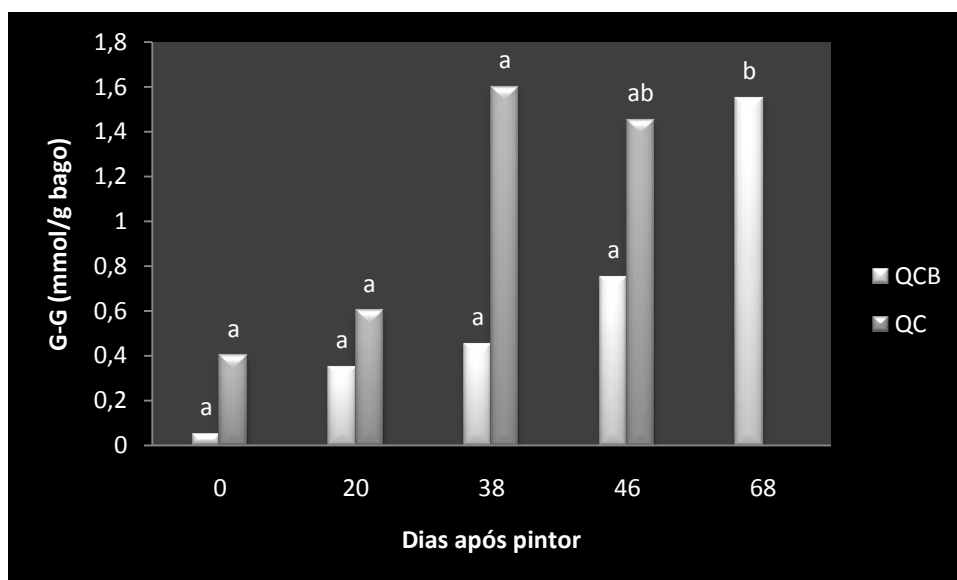


Figura 25: Influência da Altitude nos precursores de aroma em bagos na casta Touriga Nacional nas Quintas do Cardo e Cova da Barca (médias com a mesma letra indicam não existir diferenças entre si para um $p < 0.05$)

Quadro 8: Precursores de aroma em $\mu\text{mol/g}$ bago e $\mu\text{mol/bago}$ à vindima, nas castas Touriga Nacional e Touriga Franca, nas Quintas Cova da Barca e do Cardo.

Casta	$\mu\text{mol/g}$ bago	$\mu\text{mol/bago}$
Touriga Franca (Quinta cova da Barca)	0.8	1.6
Touriga Franca (Quinta do Cardo)	0.4	0.5
Touriga Nacional (Quinta Cova da Barca)	1.55	1.9
Touriga Nacional (Quinta do Cardo)	1.45	2.1

8. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, apresentam-se agora as principais conclusões a retirar.

No que diz respeito ao controlo de maturação, verifica-se em ambas as castas e em ambas as quintas o esperado, isto é, a acidez total diminui ao longo da maturação consequentemente o pH aumenta, aumentando também o °Brix e o peso dos bagos.

Ao comparar o efeito da altitude sobre os parâmetros em estudo, verificam-se algumas diferenças quando esta varia, ainda que algumas dessas diferenças não tenham expressão estatística. É ainda importante referir que a amostragem foi realizada em dois 'terroirs' diferentes, isto é foram recolhidas amostras de ambas as castas no Douro Superior e na Beira Interior.

As vinhas plantadas em locais mais altos, favorecem a síntese e acumulação de antocianinas no bago. Quando se comparam ambas as castas, verifica-se que é na Touriga Franca que este parâmetro assume um valor superior.

Quanto à intensidade da cor, é na Quinta do Cardo onde se encontram valores mais elevados, sendo a casta Touriga Franca a que possui maior intensidade de cor.

O grau médio de polimerização, assume um valor mais elevado na baixa altitude, quando se trata da casta Touriga Franca. O mesmo não se passa com a Touriga Nacional, que apresenta um valor de DPM superior nas vinhas mais altas.

É nas vinhas mais baixas que o valor de esterificação com o ácido gálico assume um valor mais elevado, este facto verifica-se em ambas as castas. Quando se comparam ambas as castas, encontram-se valores de %g superiores na casta Touriga Franca.

O mesmo não se verifica quando se compara os valores de percentagem de prodelphinidnas, pois é nas vinhas mais altas em ambas as castas que esta assume um valor mais alto. Se se comparar %p em ambas as castas verificam-se valores superiores na casta Touriga Franca.

Em contra partida, quando se compara o valor de proantocianidinas em ambas as quintas, encontram-se valores superiores na quinta que se encontra mais baixa, sendo esta situação verificada em ambas as castas. Se se comparar as castas, verifica-se que a Touriga Franca tem um valor mais elevado de proantocianidinas que a Touriga Nacional

Finalmente, ao analisar os precursores glicosilados do aroma, em ambas as quintas e em ambas as castas, verifica-se que é na quinta mais alta que estes assumem um valor mais elevado, exceptuando no final da maturação. Quando se comparam as castas, é na Touriga Nacional que se encontram valores superiores de precursores.

De um modo geral, tudo indica que nas vinhas que se encontram mais altas, há uma melhoria das condições para o bom desenvolvimento das uvas, isto porque favorece a acumulação de certos compostos na uva, como é o caso das antocianinas e precursores de aroma.

9. Referências bibliográficas

- Araújo, I. (2004) – Características aromáticas e cromáticas das castas Amarel e Vinhão. Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia. Universidade do Porto. Porto
- Alonso, J. (2009) – Monda de cachos: Efeito da época e da intensidade na cv. Syrah. Dissertação para obtenção do grau Mestre em Viticultura e Enologia. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa
- Baltenweck-Guyot R., Trendel J.-M., Albrecht P., Schaeffer A. (1996) - Mono- and diglycosides of (E)-6,9-dihydroxymegastigma-4,7-dien-3-one in Vitis vinifera wine. *Phytochemistry*, **43** (3): 621-624
- Bate-Smith, E. C. (1954a) - Adstringency in foods. *Food*. **23**: 124.
- Bate-Smith, E. C. and Swain; (1962) - Flavonoid Compounds in Comparative biochemistry. M. a. M. Florkin. New-York, Academic Press. **3**: 755-809
- Baumes R.L., Bayonove C.L., Günata Y.Z. (1994) - Connaissances actuelles sur le potentiel aromatique des muscats. *Prog. Agric. Vitic.*, **111** (11): 251-256
- Bayonove, C.; Cordonnier, R. (1971) – Recherches sur l'arôme du Muscat III. Étude de la fraction terpénique. *Ann. Technol. Agric.*, **20**: 347-355.
- Bayonove, C.; Cordonnier, R. (1979) – Les composés variétales et pré fermentaires de l'arômes des vins. *Rev. Franç. Oenol.*, **74**: 79-90
- Bento, S. (2006) – Comparação de métodos de extracção de compostos fenólicos de uvas com vista ao estabelecimento de índices de maturação fenólica, aplicação nas castas Touriga Nacional, Cabernet Sauvignon e Syrah. *Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agrónómica*, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa
- Biron C., Cordonnier R.E., Glory O., Günata Y.Z., Sapis J.C. (1988) - Étude, dans le raisin, de l'activité α -glucosidase. *Conn. Vigne Vin*, **22**(2): 125-134
- Bourzeix, M. (1976) – Les composés phénoliques des raisins et du vin. Leurs effects sur la qualité. *Rev. Franç. Oenol.*, **63**: 53-69
- Cabrita, M.J.; Ricardo da Silva, J.; Laureano, O. (2003) – Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. *1º Seminário Internacional de Vitivinicultura*. INIFAP/CYTED, Ensenada, México, pag.61-90.
- Champagnol, F. (1984) – Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture général. Publication de l'auteur. ENSA. Montpellier.
- Cordonnier, R.E.; Bayonove, C.L. (1979) – Les composés variétales et préfermentaires de l'arôme des vins, *Rev. Franc. d'Oenol.*, **15**: 269-286.

- Cordonnier, R.E. (1986) – Donnes récents sur les précurseurs d'arôme du raisin. Perspectives de exploitation en vinification. *Rev.Franç.d'Oenol.* **102**: 29-41
- Cordonnier, R.E.; Bayonove, C.L.; Baumes, R.L. (1986) – Donnés recents sur les precurseurs d'arôme du raisin. Perspectives de leur exploitation en vinification, *Rev. Franc. d'Oenol.*, (Cahier Scientifique), **102**: 29-41.
- Cosme, F.; Ricardo da Silva, J.; Laureano, O. (2009) – Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry.* **112**: 197-204
- Curvelo-Garcia, A.S. (1988) – Controlo da qualidade dos vinhos. Química Enológica, Métodos analíticos. Instituto da Vinha e do Vinho, Lisboa
- Czochanska, Z.; Foo, L.Y.; Porter, L.J. (1979) – Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, **18**: 1819-1822
- Davies, A., Mazza, G. (1993) - Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 716-720
- Darné, G. (1988) – Évolution des differents anthocyanes des pellicules de Cabernet Sauvignon au cours du développement des baies. *Conn. Vigne Vin*, **22**: 225-231
- De Freitas, V. (1995) – Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. *Thèse.* Université de Bordeaux II. France
- Di Stefano, R.; Giolfi, G.; Delfini, C. (1981) – Composti volatitli prodotti dai lieviti. *Riv. Vitic.Enol.*, **8**: 721-722
- Di Stefano, R. (1982) – Presenza di precursori del linalool nel moscato bianco del Piemonte. *Vignivini.* **9**: 45-47
- Di Stefano, R. (1996). Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, Vol. XXVII , pp. 33–49.
- Do Ó-Marques, J.; Reguinga, R.; Laureano, O.; Ricardo da Silva, J. (2005) – Changes in grape seed, skin and pulp condensed tannin during berry ripening: effects of fruit pruning. *Ciência Téc. Vitiv.* **20** (1): 35-52
- Dumazert, G.; Margulis, H.; Montreau, F.R. (1973) – Evolution des composes phénoliques au cours de la maturation d'un *Vitis vinifera* blanc: le Mauzac. *Ann.Technol.Agric.* **22**: 137-151

- Farinha, J. (2007) – Influência do sistema de condução no comportamento agronómico e fisiológico da casta Syrah. Relatório do trabalho de final de curso em Engenharia Alimentar, ISA, UTL
- Fernandez-de-Simon, B.; Hernandez, T.; Estrella, I.; Gómez-Corovés, C. (1992) – Variation in phenol content in grapes during ripening; low-molecular-weight phenols. *Z.Lebensm. Unters.Forsch.* **194**: 351-354
- Geny, L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F.; Glories, Y. (2003) – Composition and cellular localization of tannins in grape seeds maturation. *J. Food Chem.*, **51**: 8051-8054
- Gholami, M.; Coombe, B.G.; Robinson, S.P.; Williams, P.J. (1996) – Amounts of glycosides in grapevine organs during berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2**: 59-63.
- Gomes, F.C.V. (2007) – Hiperoxigenação: Avaliação fenólica e sensorial de um vinho base para espumante da casta bical. *Relatório fim de curso em Engenharia Agro-Alimentar*, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa
- Gonzalez San-José, M. L.; Barron, L. J. R; Diez, C. (1990) – Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape variety (Vitis vinifera) using polynomial regression models. *J.Sci.Food Agric.*, **51**:337-343
- Guedes de Pinho P., Falqué E., Castro M., Oliveira e Silva H., Machado B, Silva Ferreira A. C. (2007) - Further insights into the floral character of Touriga Nacional wines. *Journal of Food Science* **72** (6): S396-S401
- Günata, Y.Z.; Bayonove, C.L.; Cordonnier, R.E. (1985a) – The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma compounds. *J. Chromatogr.*, **31**: 83-90.
- Günata, Z.; Bayonove, C.; Baumes, R.; Cordonnier, R. (1985b) – The aroma of grape II. Localization and evolution of free and bound fractions of some grapes aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *J.Sci.Food Agric.*, **36**: 857-862
- Günata, Z., Baumes R.L., Sapis J.C., Bayonove C.L. (1990) *Activités glycosidases en vinification. Perspectives d'exploitation des précurseurs d'arôme, de nature glycosidique.* *Rev.Fr. OEnol.*, **122**: 37-41
- Günata, Z. (1995) – Etude et exploitation par voie enzymatique dès précurseurs d'arôme du raisin de natures glycosidiques. *Revue des OEnologues*, **74**:22-27

- Hanlin, R.; Downey, M. (2009) - Condensed Tannin accumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grape during berry development. *Am. J. Enol. Vitic* **60**:1
- Haslam, E. (1989). Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited. Cambridge, Cambridge University Press.
- Harborne, J.B. (1988) – The flavonoids: Advances in research since 1980. Chapman E. Hal, London
- Heredia, F., Francia-Aricha, E., Rivas-Gonzalo, J., Vicario, I., Santos-Buelga, C. (1988) - Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chemistry* **63**: 491-498
- Hill, G.; Stellwaag-Kittler, Huth, G. & Schloesser, E. (1981) – Resistance of grapes in different developmental stages to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, **102**:328-338
- Hrazdina, G.; Parsons, G.F.; Mattick, L.R. (1984) – The flavonoids: advances in research since 1980. Chapman E. Hall, Londres
- Ivanov, V., Carr, A., Frei, B. (2001) - Red wine antioxidants bind to human lipoproteins and protect them from metal-dependent and independent oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4442-4449
- Jordão, A.M.; Ricardo da Silva, J.M.; Laureano, O. (1998) – Evolution of anthocyanins during grape maturation of two varieties (*Vitis vinifera* L), Castelão Francês and Touriga Francesa. *Vitis*, **37**: 93-94
- Jordão, A.; Ricardo da Silva, J.; Laureano, O. (1998) – Influência da rega na composição fenólica das uvas da casta Touriga Franca (*Vitis vinifera* L.). *Ciencia y tecnología alimentaria*, **2** (2): 60-73
- Jordão, A.; Ricardo da Silva, J.M.; Laureano, O. (2001) - Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelão Francês and Touriga Francesa. *Am.J.Enol.Vitic.*, **52**: 230-234
- Kennedy, J.; Matthews, M.; Waterhouse, A. (2000a) – Changes in grape seeds polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, **55**: 77-85
- Kennedy, J.; Gordon, J.T.; John, R.; Donald, R.; Davis, H.; Charles, R.; Renata, R.; Patrick, G.; Graham, P. (200b) – Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape and Wine res.* **6** (3): 244-254
- Kennedy, J.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E.; Jones, G. (2001) – Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food chem.*, **49**: 5348-5355

- Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 2719–2723
- Laranjinha, J., Cadenas, E. (1999) - Redox cycles of caffeic acid, tocopherols and ascorbate: implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. *Life*, **48**: 57-65.
- Lee, C., Jaworski, A. (1990) - Identification of some phenolics in White grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1**: 43-46.
- Lepe, J.S. (1995) – Aromas de fermentación, defectos olfativos y metabolismo microbiano. XXI *congreso Mundial de la Vina e el vino, 75ª Asamblea General de la O.I.V, Uruguay, 27 noviembre – 4 Diciembre*, 95-120
- Lland, P.; Cynkar, W.; Francis, I.; Williams, P.; Coombe, B. (1996) – Optimisation of methods for the determination of total and red-free glycosil glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Aust. J. Grape and Wine Research*. **2**: 171-178
- Marinos V.A., Tate M.E, Williams P.J. (1994) - Protocol for FAB MS/MS characterization of terpene disaccharides of wine. *J. Agric. Food Chem.*, **42** (11): 2486-2492
- Martins, R. (2007) – Efeito da monda de cachos na produção e qualidade das uvas e do vinho, casta Syrah. Dissertação de Mestrado em Viticultura e Enologia. Instituto Superior de Agronomia, UTL, Lisboa
- Mateus, N; Marques, S; Gonçalves, A.; Machado, J.; Freitas, V. (2001) – Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from Douro valley during repening: influence of cultivation altitude. *Am. J. Enol. Vitic.* **52** (2): 115-121
- Mateus, N.; Machado, J.; Freitas, V. (2002) – Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grape grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *J. Sci. Food Agric.* **82**: 1689-1695
- Mazza, G. e Brouillard, R. (1987) - Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry* **25**: 207-225
- Mehansho, H.; Butler, L.G.; Carlson, D.M. (1987) – Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions and defense mechanisms. *Ann. Rev. Nutr.*, **7**:423-440

- Martins, R.A.S. (2007) – Efeito da monda de cachos na produção e qualidade das uvas e do vinho, casta Syrah. Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia, Instituto Superior de Agronomia, UTL, Lisboa.
- Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo da Silva, J. (2003) – Monomeric, Oligomeric and Polymeric Flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 6475-6481
- Moutinho-Ferreira, V. (2006) – evolução do grau polimerização dos taninos ao longo da maturação da uva (casta Touriga Nacional). Relatório do trabalho de fim e curso em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa
- Oliveira, J. (2000) – Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade sãs castas Loureiro e Alvarinho. Tese de Doutoramento. Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica
- Oliveira, C.; Ferreira, A.; Costa, P.; Guerra, J.; Pinho, P. (2004) – Effect of some viticultural parameters on grape carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 4178-4184
- Pereira, M. (2008) – Comparação dos parâmetros analíticos de uvas e vinhos provenientes de duas vinhas de idades diferentes na região de Valdepeñas na casta 'Tempranillo' Relatório do trabalho de fim de curso em Engenharia Alimentar. ISA. UTL Lisboa
- Piretti, M., Ghedini, M., Serrazanetti, P. (1976) - Isolation and identification of polyphenolic and terpenoid constituents of *Vitis vinifera*. *Annal. Chem.* **66**: 429-437
- Peynaud, E.; Ribéreau-Gayon, P. (1971) – The biochemistry of fruit and their products. A.C. Hulme Ed., Academic Press London, **2**.
- Peynaud, E.; Blouin, J. (1997) – *O gosto do vinho. O grande livro de prova*. Litema editora, Lisboa
- Pinhão, P. (2007) – Efeitos da aplicação em vinhos de enzimas pectolíticas com actividades glicosidásicas reforçadas nos precursores de aroma varietal nas castas: Arinto, Alvarinho, Alvarelhão, Castelão e Touriga nacional. Relatório do trabalho de fim de curso em Engenharia Agronómica, ISA, UTL, Lisboa
- PIRIE, A.J.G.; MULLINS, M.G. (1977) – Interrelationships of sugars, anthocyanins, total phenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening. *Am.J.Enol.Vitic.*, **28**: 204-209

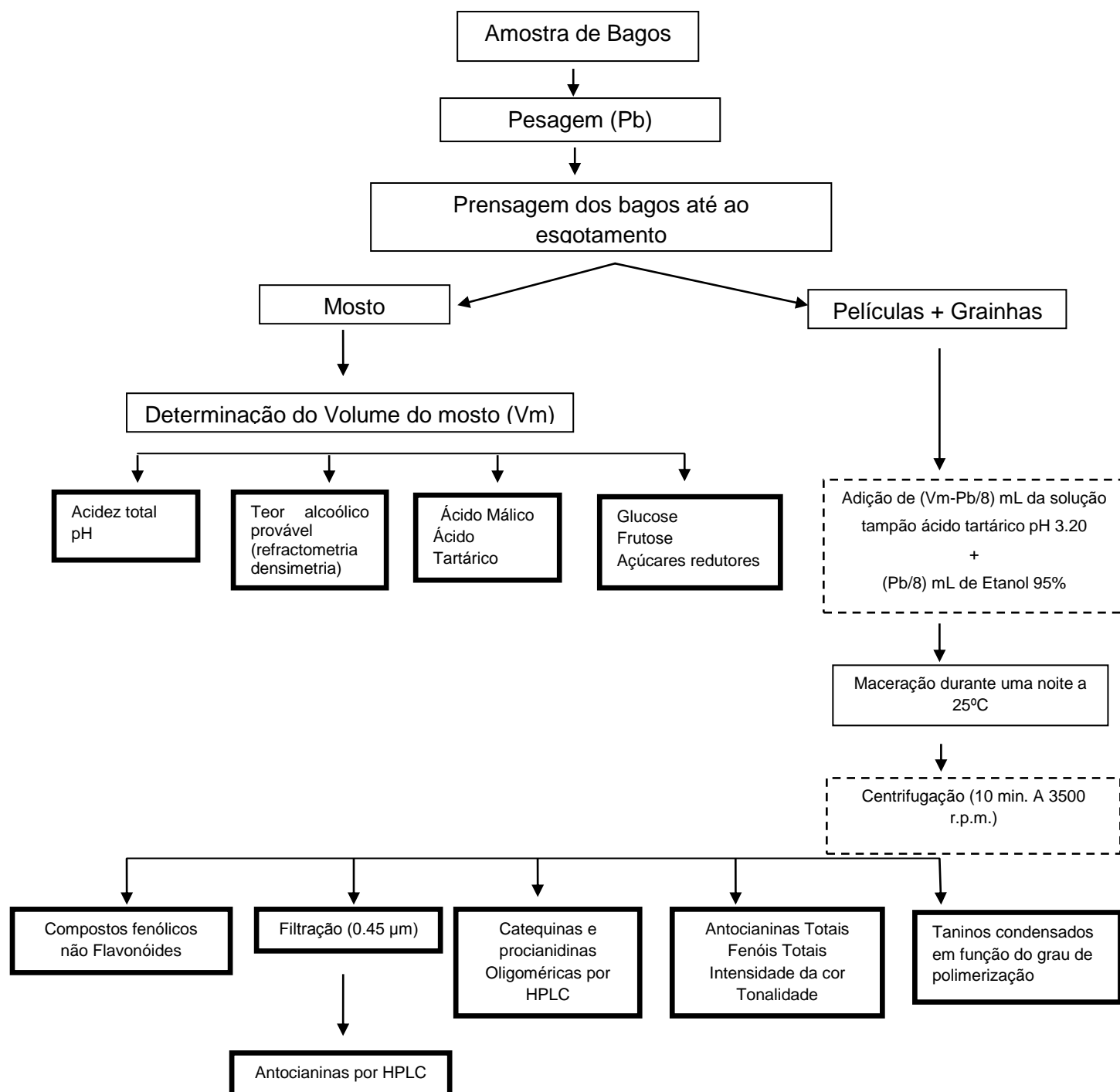
- Porter, L. J. (1988) - Flavans and proanthocyanidins. In: The Flavonoids: Recent advances since 1980. Ed. Harborne, J. B., Chapman & Hall, London.
- Razungles A., Günata Y.Z., Pinatel S., Baumes R.L., Bayonove C.L. (1993) - Étude quantitative de composés terpéniques, norisoprénoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sci. Aliments*, **13**: 59-72
- Regina, M.; Do Carmo, E.; Fonseca, A.; Purgatto, E.; Shiga, T.; Lajolo, F.; Ribeiro, A.; Da Mota, R. (2009) – Influência da altitude qualidade das uvas ‘Chardonnay’ e ‘Pinot noir’ em Minas Gerais. *Rev. Bras. Frutic.* **32** (1): 143-150
- Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Ribéreau-Gayon, P.; Sudraud, P. (1975) – Sciences et techniques du vin, Caractères des vins, maturation du raisin, levures et bactéries. Traité d’oenologie. Dunod, Paris. **2**.
- Ribéreau-Gayon, J.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. (1998) – Microbiologie du vin. Traité d’oenologie. **1**: 293-315
- Ribéreau-Gayon, P. e Stonestreet E. (1965) - Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* **9**: 2649-2652
- Ribéreau-Gayon, P. (1982) – The anthocyanins of grapes and wines in *Anthocyanins as Food colors*, Markakis, P. (ed), Academic Press, New York
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2000) – Handbook of enology. Volume 2 - *The chemistry of wine, stabilization and treatments*. Wiley, west Sussex
- Ribichaud, J. L., Noble, A. C. (1990) - Astringency and bitterness of selected phenolic in wines, *J.Sci. Food Agric.* **53**: 343–353
- Ricardo da Silva, J. M. (1995). Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho. Efeitos potenciais na saúde. *3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*. Évora, Portugal. Vol **2**: 343-355
- Ricardo-da-Silva, J.M.R. (2000) – Acção de enzimas glicosidásicas no Aroma Varietal dos vinhos: utilização de preparações comerciais em vinificação. *Provas de Agregação (Lição de Síntese)*, Instituto Superior de Agronomia (UTL).
- Santos, J.G.R. (2007) – Influência dos filmes reflectores na qualidade da uva. Análise dos metabolitos secundários glicosilados pelo método glicosil-glucose. *Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica*, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000) - Proanthocyanidins and tannin like compounds- nature occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1094-1117

- Sepúlveda, D. (2005) – Interferência dos flavonóis glucosilados na determinação dos precursores de aroma varietal pelo método Glucosil-Glucose (G-G). *Relatório do trabalho final de curso em Engenharia Agronómica*. ISA, UTL. Lisboa
- Sevinete-Pinto, F. (2002) – Caracterização fenólica das castas Tinta Roriz, Touriga Franca e Touriga Nacional, produzidas na região do Douro: estudo ao longo da maturação, maceração fermentativa e conservação. *Relatório do trabalho de fim de curso em Engenharia Agro-Industrial*. ISA, UTL. Lisboa
- Synge, R.L.M. (1975) – Interactions of polyphenols with proteins in plants and plants products. *Qual. Plant. – Pl. Fds. Hum. Nutr.*; **24**:337-350
- Soleas, G., Grass, L., Josephy, D., Goldber, D., Diamandis, E. A (2002) - comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols - *Clinical Biochemistry*, **35**: 119-124
- Somers, T.C. (1976) – Pigment development during ripening of grape. *Vitis*, **14**: 269-277
- Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (2000). Les proanthocyanidines du raisin. *Bulletin de l'OIV*, **73**: 601–609.
- Sousa, I (2010) – Precusores aromáticos em uvas: influência da casta e do sistema de condução da vinha no perfil aromático de vinhos do Porto. Tese de Mestrado em Controlo da Qualidade. Faculdade de Ciência da Universidade do Porto. Porto
- Vicens, A. (2007) – Etude de l'évolution des composes phenoliques et des polysaccharides parietaux de la pellicule de raisin pendant la maturation – impact sur leur extractibilite en milieu hydroalcoolique. Tese de douturamento. Universidade de Montpellier II. Montpellier.
- Williams (1984) – Pesquisar tese araujo
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B. (1981) – Classification of the monoterpenoid composition of Muscat grapes. *Am.J.Enol.Vitic.*, **32**:2039-2041
- Williams, P.J.; Strauss C.R.; Wilson B.; Massy-Westropp, R.A. (1982b) - Studies on the hydrolysis of Vitis vinifera monoterpene precursor compounds and model monoterpene-β-D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **30** (6): 1219-1223
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B.; Massy-Westropp, R.A. (1983) – Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol. *Phytochemistry*. **22**: 2039-2041

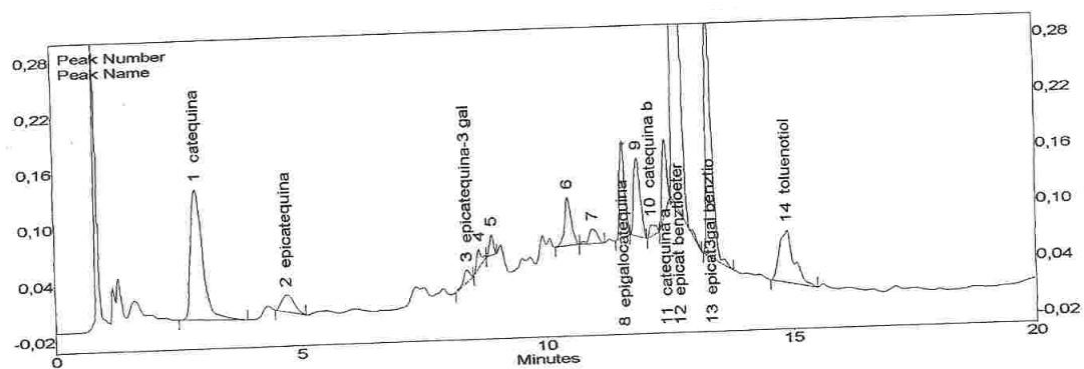
- Williams, P.J.; Strauss, C.R.; Wilson, B.; Dimitriadis, E. (1984) - Recent studies into grape terpene glycosides. In: *Proceedings of the 4th Weurman Flavour Symposium*, Dourdan, France, 9-11 May, 349-357
- Williams, P.J.; Cyncar, W.; Francis, I.L.; Gray, J.D.; Iland, P.G.; Coombe, B.G.(1995b) - Quantification of Glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl-glucose (G-G). *J. Agric. Food Chem.* **43**: 121–128.
- Wilson, B.; Strauss, C.R.; Williams, P.J. (1986) – The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice and pulp fractions of some white grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**: 107-112.
- Winterhalter, P.; Skouroumounis, G.K. (1997) - Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 55: *Biotechnology of Aromas*. R.G. Berger (Ed.), Springer Verlag: Heidelberg, Germany, 73-105
- Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.C.; Gump, B.H.; Nury, F.S. (1995) - Wine analysis and production. *The Chapman & Hall Enology Library*. International Thompson Publishing

Anexos

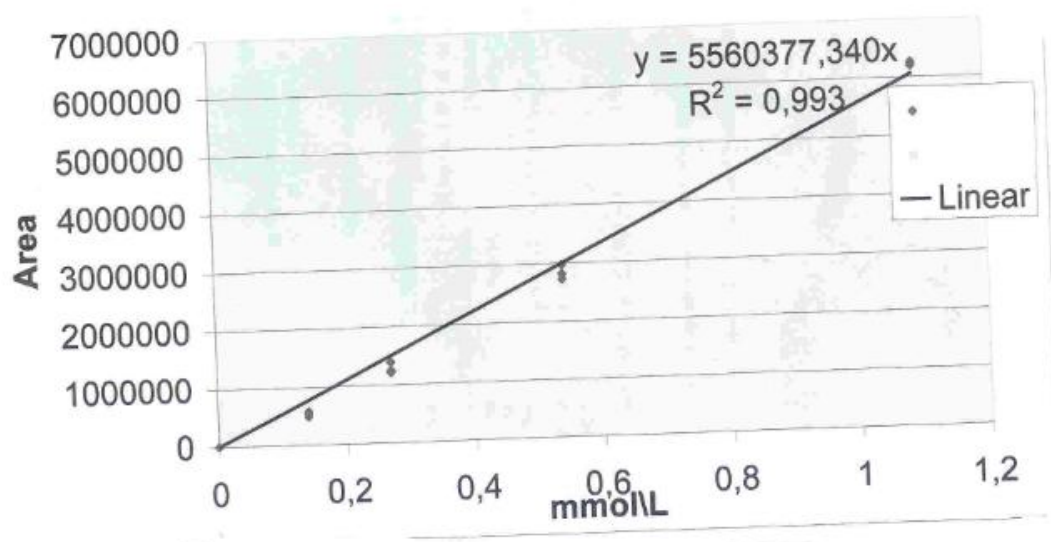
Anexo 1 - Metodologia estabelecida por Carboneau e Champagnol (1993)



Anexo 2: Cromatograma em HPLC para identificação das unidades terminais e de extensão

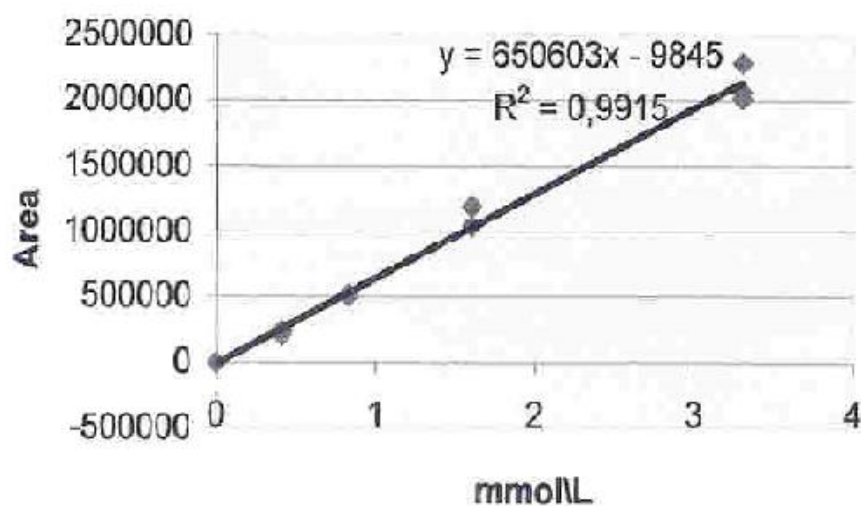


Anexo 3: Curva Padrão da Epicatequina Galato

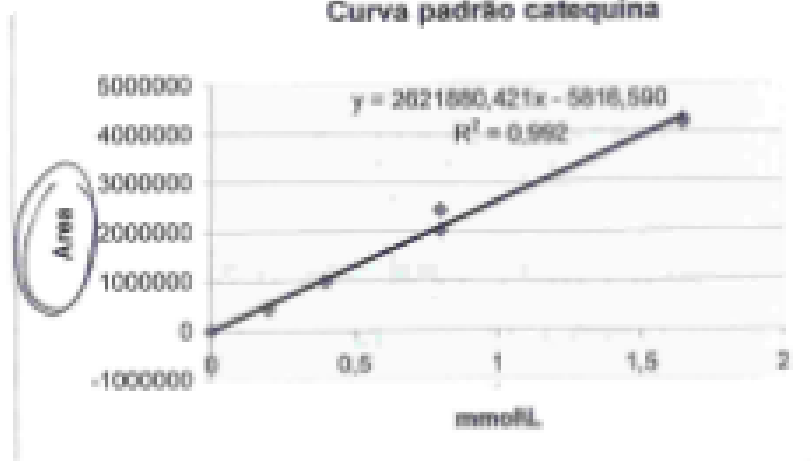


Anexo 4: Curva padrão da epigallocatequina e Catequina

Curva padrão da epigallocatequina



Curva padrão catequina



Anexo 5: Cálculos das proantocianidinas e suas unidades estruturais

$$\text{mDP} = \Sigma \text{ unidades totais} / \Sigma \text{ unidades terminais}$$

$$\%g = (\Sigma \text{ unidades epicatequina galato} / \Sigma \text{ unidades totais}) \times 100$$

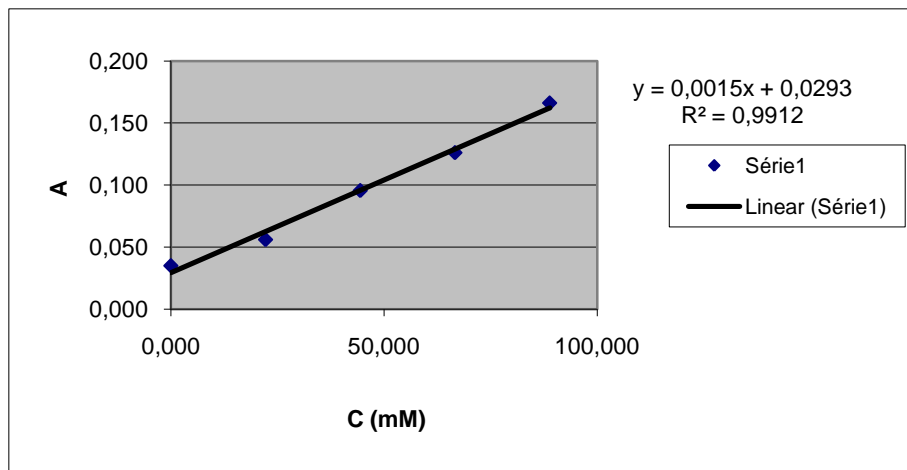
$$\%p = (\Sigma \text{ unidades epigallocatequina} / \Sigma \text{ unidades totais}) \times 100$$

$$\text{Peso molecular médio (PMm)} = \text{mDP} \times (288 + (152 \times \%g / 100) + (16 \%p / 100)) + 2$$

$$\text{Proantocianidinas (PA)} = \text{PMm} \times \Sigma \text{ unidades terminais}$$

Anexo 6: Curva Padrão para Calcular os precursores glicosilados – Curva hidrolisada e curva não hidrolisada

Curva hidrolisada



Curva não hidrolisada

